

Universität
Rostock



Traditio et Innovatio

„Ätiologie der chronischen Pankreatitis – Ein immunologischer Ansatz“

Inauguraldissertation zur
Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin
der Universität Rostock

**Zentrum für Innere Medizin
Klinik für Innere Medizin II
Abteilung Gastroenterologie
Universität Rostock**

vorgelegt von:

Kai Lukas Rieckeheer

aus Remseck am Neckar
geboren am 18.07.1976 in Münster

Rostock, 2012

Dekan:

Prof. Dr. med. Emil Christian Reisinger,
Klinik für Innere Medizin II, Abt. Tropenmedizin und Infektionskrankheiten, Universität Rostock

1. Gutachter:

PD Dr. med. Jutta Merkord,
Institut für Toxikologie und Pharmakologie, Universität Rostock

2. Gutachter:

Prof. Dr. med. Matthias Löhr
Department of Clinical Science, Intervention and Technology (CLINTEC), Karolinska Institutet,
Karolinska University, Stockholm

3. Gutachter:

Prof. Dr. med. Robert Jaster
Klinik für Innere Medizin II, Abt. Gastroenterologie, Universität Rostock

Datum der Einreichung: 30.01.2012

Datum der Verteidigung: 08.08.2012

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Historischer Rückblick.....	1
1.2 Definition der chronischen Pankreatitis.....	1
1.3 Epidemiologie.....	3
1.4 Klinik.....	4
1.5 Diagnose.....	6
1.6 Ätiologie.....	7
1.6.1 Alkoholische chronische Pankreatitis.....	8
1.6.2 Idiopathische chronische Pankreatitis.....	10
1.6.3 Autoimmunpankreatitis (AIH).....	10
1.7 Pathogenese.....	11
1.7.1 Obstruktionstheorie (Sarles).....	11
1.7.2 Toxisch-metabolische Theorie (Bordalo).....	12
1.7.3 Detoxifikationstheorie (Braganza).....	12
1.7.4 Nekrose-Fibrose-Theorie (Klöppel).....	12
1.8 Tiermodelle der chronischen Pankreatitis.....	13
1.8.1 WBN/Kob Ratte mit spontaner Pankreatitis.....	13
1.8.2 Cerulein.....	14
1.8.3 TNBS (2,4,6-Trinitrobenzensulfonsäure).....	14
1.8.4 Alkohol-Fütterung.....	15
1.8.5 TGF- β 1-transgene Mäuse.....	15
1.8.6 Operative Gang-Ligatur / Closed duodenal Loop (CDL).....	16
1.8.7 MHC-II knock-out Mäuse.....	16
1.8.8 Dibutyl-Zinn-Dichlorid (DBTC).....	16
1.9 Problemstellung.....	17
2. Material und Methoden	19
2.1 Versuchstiere und Haltung.....	19
2.2 Modell der DBTC-Pankreatitis.....	19
2.2.1 Chemikalien.....	19
2.3 Methoden.....	20
2.3.1 Gewinnung der Organe.....	20

2.3.1.1	Narkose.....	20
2.3.1.2	Organ-Entnahme.....	20
2.3.2	Isolation der Lymphozyten.....	20
2.3.2.1	Isolation der Blut-Lymphozyten (PBMC).....	20
2.3.2.2	Isolation der Lymphknoten-Lymphozyten (LNC).....	21
2.3.2.3	Isolation der Milz-Lymphozyten (SMC).....	21
2.3.2.4	Chemikalien.....	21
2.3.3	Zählung der isolierten Lymphozyten.....	22
2.3.4	Methode des Lymphozyten-Transfers.....	23
2.3.4.1	Kontrollen.....	24
2.3.5	Nachweis von Pankreas-Enzymen im Serum.....	25
2.3.5.1	α -Amylase.....	25
2.3.5.2	Lipase.....	25
2.3.6	Immunhistochemie (IHC)-Färbung.....	26
2.3.6.1	Prinzip.....	26
2.3.6.2	Chemikalien.....	27
2.3.6.3	Färbung der Gewebeschnitte.....	28
2.3.6.4	Auszählung der gefärbten Gewebsschnitte.....	29
2.3.7	Fluoreszenz-aktivierte Zell-Sortierung (FACS-Analyse).....	29
2.3.7.1	Prinzip.....	29
2.3.7.2	Identifizierung der mononukleären Zellen.....	31
2.3.7.3	Messung und Auswertung.....	31
2.3.7.4	Chemikalien.....	32
2.3.8	Extraktion der RNA.....	33
2.3.8.1	Chemikalien.....	34
2.3.9	Reverse Transkription und Polymerasekettenreaktion (RT-PCR).....	35
2.3.9.1	Prinzip.....	35
2.3.9.2	Chemikalien.....	37
2.3.9.3	Reverse Transkription (RT).....	38
2.3.9.4	kompetitive Polymerasekettenreaktion (PCR) mit Kontrollfragment (KF).....	38
2.3.10	Zytokin-Nachweis mittels PCR und Gelelektrophorese.....	40
2.3.10.1	Auswertung der Gel-Elektrophorese.....	41
2.4.	Statistische Auswertung.....	41

3. Ergebnisse	42
3.1 Ergebnisse der Makroskopischen Auswertung.....	42
3.2 Ergebnisse der Histologie (HE-Färbung).....	44
3.3 Ergebnisse der Immunhistochemie (IHC).....	48
3.3.1 CD4 ⁺ -T-Lymphozyten.....	51
3.3.2 CD8 ⁺ -T-Lymphozyten.....	52
3.3.3 CD25 ⁺ -T-Lymphozyten.....	53
3.3.4 Makrophagen.....	54
3.3.5 Granulozyten.....	55
3.4 Ergebnisse der RT-PCR.....	56
3.4.1 Interferon- γ (IFN- γ).....	56
3.4.2 Interleukin-2 (IL-2).....	57
3.4.3 Interleukin-2-Rezeptor (IL-2-R).....	58
3.4.4 Interleukin-5 (IL-5).....	59
3.4.5 Interleukin-6 (IL-6).....	60
3.4.6 Interleukin-10 (IL-10).....	61
3.4.7 Interleukin-4 (IL-4).....	62
3.5 Ergebnisse der Pankreas-Enzym-Bestimmung im Serum.....	63
3.5.1 Serum-Amylase.....	63
3.5.2 Serum-Lipase.....	64
3.6 Ergebnisse der FACS-Analyse.....	65
3.6.1 Durchflusszytometrie (FACS) Blut-Leukozyten (PBMC).....	66
3.6.2 Durchflusszytometrie (FACS) Lymphknoten-Leukozyten (LNC).....	67
3.6.3 Durchflusszytometrie (FACS) Milz-Leukozyten (SMC).....	67
4. Diskussion	69
4.1. Grundlagen.....	70
4.2. Hypothese: Übertragbarkeit der chronischen DBTC-Pankreatitis durch Transfer von Lymphozyten.....	70
4.3. DBTC-Tiermodell und Lymphozyten-Transfer.....	71
4.4. Veränderungen durch den Lymphozyten-Transfer.....	72
4.5. CD4 ⁺ - und CD8 ⁺ -T-Lymphozyten.....	75
4.6. IFN- γ und IL-2.....	75
4.7. Kontroll-Untersuchungen zum Lymphozyten-Transfer.....	76
4.8. Ausblick.....	77

5. Zusammenfassung	80
6. Thesen	83
7. Literaturverzeichnis	86
8. Abkürzungsverzeichnis	I
9. Danksagung	III
10. Selbständigkeitserklärung	IV
11. Lebenslauf	V

1 Einleitung

1.1 Historischer Rückblick

Das Pankreas wird erstmalig in einem babylonischen Talmud erwähnt, in dem eine Struktur als „Finger der Leber“ bezeichnet wird. Galen beschrieb das Organ ausführlich, jedoch waren weder er noch Hippokrates, Erasistratus oder Herophilus in der Lage, eine Beziehung zwischen Struktur und Funktion herzustellen. Der Bezeichnung Pankreas gründet sich auf Rufus von Ephesus (100 v. Christus) und ist zusammengesetzt aus den griechischen Wörtern *pan*: gesamt und *kreas*: Fleisch.

Andreas Vesalius (1514 – 1564) beschrieb die Anatomie des Pankreas schon recht genau, jedoch dauerte es bis zum 17. Jahrhundert bis Sylvius und sein Schüler Regnier de Graff von Delft durch die experimentelle Kanülierung des Pankreasganges bei Hunden erste Hinweise auf die Funktion erkannten. Der Name „Bauchspeicheldrüse“ wird von Sommering (1755 – 1830) in die medizinische Literatur eingeführt, was dazu führte, dass das Pankreas bis Ende des 18. Jahrhunderts als abdominelle Speicheldrüse angesehen wurde. Das Trypsin wurde von Willy Kuhne (1837 – 1900) entdeckt. Kurz vorher (1815) hatte Alexander Marcet (1770 – 1822) die Lipase identifiziert. In den weiteren Jahren wurde die exokrine Funktion des Pankreas zunehmend besser verstanden. Im Jahr 1869 gelang es Paul Langerhans erstmalig, die Aufgaben des Pankreas in eine endokrine und exokrine Funktion zur Regulation des Stoffwechsels und der Digestion zu differenzieren.

Bereits 1896 stellte Hans Chiari in der „Zeitschrift für Heilkunst“ die Hypothese auf, dass die Pankreatitis Folge einer Selbstverdauung des Organs sei ⁽¹⁾.

1.2 Definition der chronischen Pankreatitis (cP)

Auf mehreren internationalen Symposien wurden Definitionen und Klassifikation der chronischen Pankreatitis erarbeitet: **Marseille** 1963 ⁽¹⁰³⁾, **Cambridge** 1983 ⁽²⁾, **Marseille** 1984 ⁽³⁾, **Marseille-Rom** 1988 ⁽⁴⁾, **TIGAR-O 2001** ⁽²⁰⁾ und **M-ANNHEIM** 2007 ⁽⁵⁵⁾. In Marseille wurde 1963 erstmals zwischen akuter und chronischer Pankreatitis unterschieden. Die Klassifikation von Cambridge 1983 erlangte vor allem Bedeutung wegen der Einteilung der chronischen Pankreatitis mittels bildgebender Verfahren ⁽²⁾. In der revidierten Marseille - Klassifikation von 1984 ⁽³⁾ wurde als Sonderform die obstruktive chronische Pankreatitis beschrieben. Dabei verursacht eine Obstruktion proximal die Dilatation des Pankreasgangsystems. Beseitigung der Obstruktion führt zu einer morphologischen und funktionellen *restitutio ad integrum* ⁽³⁾. Anhand der Klassifikation von Marseille-Rom 1988 ⁽⁴⁾

kann die chronische Pankreatitis definiert werden als eine progredient verlaufende irreversible Schädigung des Pankreas mit Ausbildung fokaler Nekrosen sowie segmentaler oder diffuser Fibrose. Die TIGAR-O-Klassifikation 2001 ⁽²⁰⁾ differenziert die Ätiologie der verschiedenen Formen der chronischen Pankreatitis (siehe **Tab. 01** unter 1.6 Ätiologie).

Histologisch sind Pankreas-Gangveränderungen, eine ausgedehnte Fibrose und zunehmende Leukozyten-Infiltrationen auffällig, sodass es auch zu einer in der endoskopisch retrograden Pankreatographie (ERP) zu einer Veränderung der sonst schlanken Gangstruktur (**Abb. 1**) kommt. Häufig resultieren diese Schädigungen auch in einer Bildung von Pankreasgangsteinen, was eine Gangerweiterung zur Folge hat (**Abb. 2**). Im Verlauf dieser Erkrankung kommt es zu einer Zerstörung des exokrinen Pankreasgewebes (Azinuszellen), die eine exokrine Insuffizienz der Bauchspeicheldrüse bewirkt. Zu einem späteren Zeitpunkt wird auch das endokrine Gewebe (Langerhans'sche Inseln) zerstört, was sich bei den betroffenen Patienten in einer diabetischen Stoffwechsellage manifestiert. Die chronische Pankreatitis verläuft meistens in Schüben, es wurden aber auch kontinuierlich fortschreitende Krankheitsbilder beschrieben.



Abb. 1: Normales retrogrades Pankreatogramm (ERP)



Abb. 2: ERP-Bild mit Pankreas-Gangdilatationen (Pfeile)

1.3 Epidemiologie

In zwei Studien der siebziger Jahre aus Kopenhagen wurden jährliche Inzidenzen von 4⁽⁵⁾ und 6,9 bis 10⁽⁶⁾ und eine Prävalenz von 13 Erkrankte pro 100.000 Einwohner⁽⁵⁾ ermittelt. Die meisten Autoren gehen davon aus, dass die Inzidenz der chronischen Pankreatitis in den Industrienationen seitdem ansteigt⁽⁷⁻¹¹⁾. In Studien aus der Schweiz⁽¹²⁾, Kopenhagen⁽⁶⁾, Japan⁽¹³⁾ und Deutschland⁽¹⁴⁾ konnte dieser Anstieg der Inzidenz bestätigt werden (siehe **Abb. 3**).

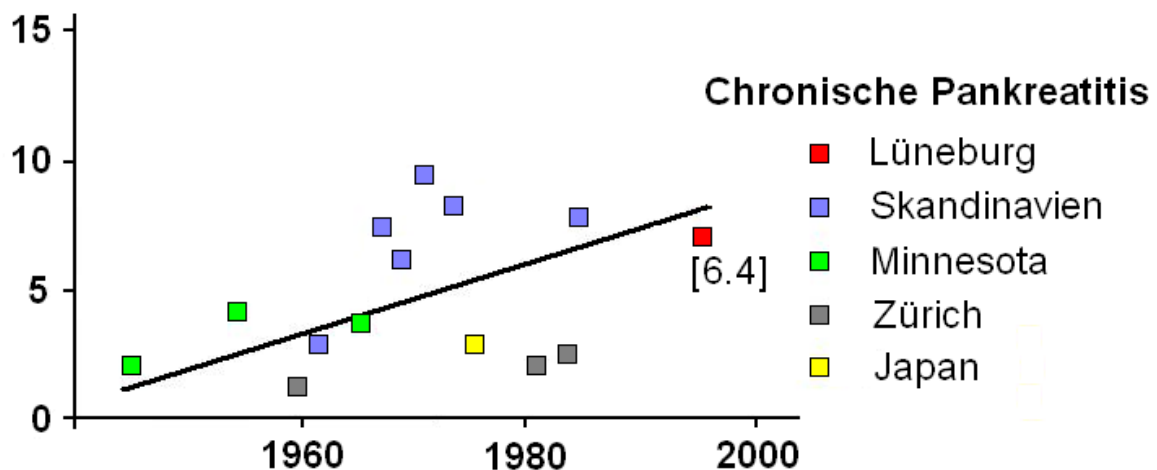


Abb. 3: Inzidenz der chronischen Pankreatitis (nach⁽¹⁴⁾)

Dabei soll es sich zum einen um eine echte Zunahme der Krankheit handeln, die auf einen vermehrten Alkoholkonsum, der nach dem 2. Weltkrieg stark anstieg, zurückgeführt wird. Andererseits beruht die erhöhte Inzidenz zum Teil lediglich auf der verbesserten diagnostischen Erfassung⁽¹³⁾, was dann nur einem scheinbaren Inzidenzanstieg entsprechen würde. Auch die deutlich gestiegene Lebenserwartung kann die epidemiologischen Daten beeinflussen. *Lin et al.* fanden 1995 in einer landesweiten Erhebung in Japan unter Verwendung moderner bildgebender Verfahren eine Gesamtprävalenz für Männer von 45,4 (Spitzenwert 115,5) und für Frauen von 12,4 (Spitzenwert 39,6) Erkrankungen pro 100.000 Einwohner⁽¹³⁾. Da kleinere Kliniken nicht berücksichtigt wurden, könnten nach Meinung der Autoren die wahren Zahlen noch höher liegen. Männer erkranken insgesamt etwa viermal häufiger an chronischer Pankreatitis als Frauen^(12/13/15/16), wofür vor allem deren Überwiegen bei der alkoholischen Form bedingt durch einen höheren Alkoholkonsum verantwortlich gemacht wird⁽⁸⁾. Während in früheren Studien auch bei der idiopathischen Pankreatitis ein Überwiegen der Männer gefunden wurde^(17/18), scheinen neueren Studien zufolge Männer und Frauen gleich häufig betroffen

zu sein ^(15/19). Bei der alkoholischen chronischen Pankreatitis liegt das Alter beim Erkrankungsbeginn gewöhnlich gegen Ende der vierten bis Anfang der fünften Lebensdekade ^(16/19). Bei der idiopathischen chronischen Pankreatitis weist die Altersverteilung zwei Gipfel auf, eine frühe "juvenile" Form mit einem Erkrankungsbeginn in der zweiten Dekade und eine späte "senile" Form mit einem Erkrankungsbeginn in der fünften Dekade ⁽¹⁷⁻¹⁹⁾.

1.4 Klinik

Das führende klinische Symptom bei der chronischen Pankreatitis sind abdominale Schmerzen ^(20/21), die zum Krankheitsbeginn von etwa 80% der Patienten mit alkoholischer Pankreatitis angegeben werden ^(12/19). Die juvenile Form der idiopathischen Pankreatitis wird häufiger (96%) und von einer hinsichtlich Intensität schwereren Symptomatik begleitet ⁽¹⁹⁾. Dagegen verläuft die spät beginnende idiopathische Form bei 26 bis 54 Prozent schmerzlos ^(17/19). Die Schmerzen werden typischerweise epigastrisch, mit Ausstrahlung in den Rücken lokalisiert. Sie haben einen bohrenden, durchdringenden Charakter, sind häufig mit Übelkeit und Erbrechen kombiniert und verstärken sich postprandial ^(21/22). Der Verlauf der Schmerzentwicklung ist jedoch individuell sehr unterschiedlich ⁽²²⁾. Die meisten Patienten mit alkoholischer Pankreatitis haben initial attackenartige Schmerzen, die erst im weiteren Verlauf kontinuierlich werden ^(12/21/23). Allerdings wurde auch in einer Reihe von Studien eine Abnahme der Schmerzintensität und -häufigkeit mit zunehmender Erkrankungsdauer beobachtet ^(15/19/23/25). *Lankisch et al.* fanden, dass 10 Jahre nach Krankheitsbeginn etwa 50 Prozent der Patienten Schmerzen angeben ⁽²⁴⁾. In einigen Studien bestand ein Zusammenhang zwischen Schmerzabnahme und Verminderung des Alkoholkonsums ⁽²⁵⁾ oder Zunahme der exokrinen Insuffizienz ⁽¹⁵⁾, wohingegen andere Studien diese Befunde nicht bestätigen konnten ^(15/19/24). Eine exokrine Pankreasinsuffizienz, die mittels quantitativer Bestimmung der Pankreas-Elastase im Stuhl erfasst wird, ist meistens schon bei Erkrankungsbeginn nachweisbar ⁽²⁶⁾. *Lankisch et al.* fanden zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bei jeweils etwa einem Drittel eine hochgradige, mäßige bzw. leichte Funktionseinschränkung, nur 2 Prozent hatten eine normale Funktion ⁽¹⁵⁾. Die exokrine Insuffizienz ist jedoch nicht zwangsläufig progredient, sondern kann auch zum Stillstand kommen oder sich bei einer Minderheit sogar wieder bessern ⁽¹⁵⁾. Eine Steatorrhoe tritt in der Regel erst bei fortgeschrittener chronischer Pankreatitis auf ⁽²²⁾, da zu deren Manifestation die exokrine Pankreassekretion unter 10 Prozent des Normalwertes absinken muss ⁽²⁷⁾. Die Steatorrhoe führt zur Diarrhoe mit

voluminösen, übel riechenden Stühlen in einer Häufigkeit von meist nicht öfter als 3- bis 4-mal pro Tag ⁽²²⁾. Die meisten Patienten mit chronischer Pankreatitis sind untergewichtig ^(21/28). Ursachen sind neben der Maldigestion Fehlernährung bei chronischen Alkoholikern ⁽²⁶⁾, bakterielle Überwucherung oder verminderte orale Nahrungsaufnahme aus Angst vor postprandialen Schmerzen ^(21/22/26/28). Neben der kalorisch unzureichenden Stoffwechsellaage kann es zu einem Mangel an Vitaminen und Spurenelementen kommen, der aber nur selten klinisch manifest wird ⁽²⁸⁾. Allerdings führt der chronisch verminderte Vitamin D - Spiegel in fortgeschrittenen Krankheitsstadien häufig zu einer geringeren Knochendichte ^(29/30/31).

Eine endokrine Insuffizienz mit sekundärem Diabetes mellitus tritt üblicherweise erst spät im Erkrankungsverlauf auf ⁽²²⁾ und findet sich bei Diagnosestellung nur bei 8 bis 10 Prozent ^(15/32), kann aber auch Erstsymptom sein ^(19/32). *Lankisch et al.* fanden nach 10 Jahren bei 78 Prozent der Patienten einen Diabetes mellitus, wovon 40 Prozent insulinpflichtig waren ⁽¹⁵⁾. Die Angaben der medianen Zeitintervalle zur Entwicklung eines Diabetes reichen bei der alkoholischen Pankreatitis von 6 bis zu 20 Jahren ⁽¹⁵⁾. Bei der juvenilen Form der idiopathischen Pankreatitis tritt ein Diabetes später auf (medianes Intervall 28 Jahre, senile idiopathische Pankreatitis – 12 Jahre) ⁽¹⁹⁾. Alkoholabstinenz kann sich günstig auf die endokrine Funktion auswirken ⁽¹⁵⁾. Das Ausmaß einer endokrinen Funktionsstörung korreliert nicht mit einer exokrinen Störung ⁽¹⁵⁾.

Die häufigste Komplikation bei der chronischen Pankreatitis sind pankreatische Pseudozysten, daneben können gastrointestinale Blutungen, Ductus choledochus-Stenosen, Duodenalstenosen und Pankreasfisteln auftreten (**Tab. 1**). Der Ductus choledochus kann im Pankreaskopfbereich durch entzündliche und fibrotische Veränderungen oder Pseudozysten komprimiert werden. In der Folge entwickelt sich das klinische Bild der Cholestase mit Erhöhung der Lebertransaminasen und der alkalischen Phosphatase im Serum, Ikterus oder Cholangitis ⁽²²⁾. Charakteristisch ist eine lange Stenose des distalen Gallengangs ^(34/35). Eine Gallengangsstenose mit typischer Schmerzsymptomatik und posthepatischem Ikterus soll bei etwa 10 Prozent der Patienten auftreten ^(22/35).

Zysten
Zysten mit Kompression benachbarter Organe
Obstruktion des Ductus choledochus (Ikterus)
Pankreasgangobstruktion
Milzvenenthrombose
Chronisches Schmerzsyndrom
Pleuraerguss
Aszites
Hämorrhagie (z.B. Pseudoaneurysma)
Pfortaderthrombose (portale Hypertonie)
Selten: Duodenalstenose (Übelkeit / Erbrechen)
Kolonstenose
Splenomegalie

Tab. 1: Komplikationen der chronischen Pankreatitis

1.5 Diagnose

Die Diagnose der chronischen Pankreatitis beruht üblicherweise auf bildgebenden Verfahren, Pankreasfunktionstests und dem Vorhandensein charakteristischer klinischer Symptome ^(36/37). Ein einzelnes Testverfahren ist in der Regel nicht ausreichend zur Diagnosestellung ^(22/38).

Als Goldstandard gilt die Histologie, die in der Routinediagnostik jedoch nur selten verfügbar ist ^(20/22). Alle diagnostischen Methoden sind in fortgeschrittenen Krankheitsstadien am genauesten, weshalb sich Schwierigkeiten in der Diagnose früher Krankheitsstadien und Erkrankungen ohne nennenswerte Parenchym- oder Gangveränderungen ("minimal change chronic pancreatitis", "small duct disease" ⁽²⁰⁾) ergeben können ^(20/22). Schwierig kann auch die Differentialdiagnose zum Pankreaskarzinom und zur akut rezidivierenden Pankreatitis sein ^(20/22). Im Gegensatz zur deutschen Therapie-Leitlinie ⁽⁹⁸⁾ herrscht international kein allgemeiner Konsens über das diagnostische Vorgehen und die Wahl des diagnostischen Verfahrens ⁽²⁰⁾. Besonders der Stellenwert der Pankreasfunktionstests in der Diagnostik der chronischen Pankreatitis ist umstritten ⁽²⁰⁾. Indirekte Pankreasfunktionstests sind in den USA zum Teil nicht erhältlich (z.B. Chymotrypsin) oder werden selten angewandt (z.B. Elastase 1) ^(20/22/26). Eine exokrine Pankreasinsuffizienz alleine ist noch nicht beweisend für eine chronische Pankreatitis, da

auch andere Ursachen in Betracht kommen, wenn diese auch erheblich seltener sind ^(20/39). Daher sehen einige Autoren die Pankreasfunktionstests erst am Ende der diagnostischen Kette als unterstützenden Hinweis, während sie für andere neben den bildgebenden Verfahren weiterhin eine zentrale Rolle in der Diagnostik haben ^(26/35/37/40). Viele Autoren sehen die Diagnose einer chronischen Pankreatitis als gesichert an, wenn pathologische direkte oder indirekte Pankreasfunktionstests in Kombination mit einer typischen Symptomatik oder bildgebenden Hinweisen einer chronischen Pankreatitis vorliegen ^(26/37/41). *Lankisch et al.* ⁽⁴²⁾ konnten zeigen, dass der Sekretin-Pankreozymin-Test zuverlässigere Vorhersageergebnisse liefert als die endoskopisch retrograde Pankreatographie (ERP), da z.B. nach einer akuten Entzündung Pankreasgangnarben persistieren können, ohne dass sich später eine chronische Pankreatitis entwickelt. Diese Befunde wurden von *Seidensticker et al.* ⁽⁴³⁾ und *Angelini et al.* ⁽⁴⁴⁾ bestätigt. Idealerweise sollte die Diagnose jedoch durch die Kombination von bildgebenden Verfahren und Funktionstests gestellt werden ⁽²⁶⁾.

1.6 Ätiologie

Für verschiedene Risikofaktoren wurde eine Assoziation mit chronischer Pankreatitis berichtet (**Tab. 2**). Eine eindeutige Ätiologie ist jedoch nur in wenigen Fällen bekannt, da das Vorhandensein einzelner Risikofaktoren in der Regel nicht ausreicht, um die Erkrankung auszulösen ⁽²⁰⁾. Alkohol wird als die dominierende Ursache der chronischen Pankreatitis in den industrialisierten Ländern weltweit angesehen ⁽¹⁹⁻²¹⁾ und für etwa 70 bis 80 Prozent der Fälle verantwortlich gemacht ^(15/21). Für etwa 10 bis 30 Prozent der restlichen Erkrankungsfälle findet sich keine zugrunde liegende Ursache (idiopathische Pankreatitis) ^(13/15/17/18/19/21/45/46). Sonstige Ursachen sind eher selten ⁽¹⁹⁾ und machen nur etwa 5 bis 10 Prozent aus ⁽²¹⁾. Etemad et. al. ⁽²⁰⁾ stellten 2001 ein neues Klassifikationssystem (TIGAR-O) vor, das die Patienten wie folgt aufteilt:

T – Toxisch-metabolisch
<ul style="list-style-type: none"> - Alkohol (70 – 80 %) - Tabak-Konsum - Hyperkalzämie (Hyperparathyreoidismus) - Hyperlipidämie (selten und umstritten) - Chronisches Nierenversagen - Medikamente (Phenacetin-Missbrauch – möglicherweise durch chron. Nierenversagen) - Toxine (Organo-Zinn-Komponenten)
I – Idiopathisch (10 – 30 %)
<ul style="list-style-type: none"> - frühe Manifestation - späte Manifestation - Tropisch (Tropisch kalzifizierende Pankreatitis, Fibrokalkulöser pankreatischer Diabetes) - Sonstige
G – Genetisch
<ul style="list-style-type: none"> - Autosomal-dominant (Kationisches Trypsinogen-Kodon 29 und 122 Mutationen) - Autosomal-rezessiv (CFTR-Mutationen, SPINK 1 Mutationen, Kationisches Trypsinogen-Kodon 16, 22, 23 Mutationen, α1-Antitrypsin Mangel – möglich)
A – Autoimmun
<ul style="list-style-type: none"> - Isolierte autoimmune chronische Pankreatitis - Autoimmunerkrankung-assoziierte chronische Pankreatitis (Sjögren Syndrom, Entzündliche Darmerkrankungen, Primär biliäre Zirrhose)
R – Rezidivierende und schwere akute Pankreatitis
<ul style="list-style-type: none"> - Post-nekrotisch (schwere akute Pankreatitis) - Rezidivierende akute Pankreatitis - Vaskuläre Erkrankungen / ischämisch - Post-Radiatio (Radiotherapie)
O – Obstruktiv
<ul style="list-style-type: none"> - Pankreas divisum - Sphinkter Oddi – Dysfunktion (umstritten) - Gangobstruktion (z.B. Tumor) - Präampulläre Duodenalwandzysten - Posttraumatische Pankreasgangnarben

Tab. 2: Ätiopathogenetische Klassifikation der chronischen Pankreatitis (nach ⁽²⁰⁾)

1.6.1 Alkoholische chronische Pankreatitis

In der Regel geht dem Auftreten erster klinischer Symptome ein jahrelanger Alkoholabusus voraus ⁽¹⁶⁾. *Cavallini et al.* ⁽⁴⁷⁾ fanden eine durchschnittliche Expositionszeit von 22 ± 11

Jahren, *Dani et al.* ⁽⁴⁸⁾ von 21 ± 8 Jahren, *Durbec und Sarles* ⁽⁴⁹⁾ bei Männern von 18 ± 11 Jahren und bei Frauen von 11 ± 8 Jahren. Die Angaben der mindestens erforderlichen Expositionsdauer reichen von 5 bis 15 Jahren ^(21/22/50). Für die Erkrankungswahrscheinlichkeit scheint nur die Alkoholmenge, nicht die Art des alkoholischen Getränks oder das Konsumverhalten (kontinuierlich versus episodisch), bedeutsam zu sein ^(51/52). Das Risiko einer chronischen Pankreatitis steigt mit der Menge des konsumierten Alkohols ⁽⁵⁰⁾. *Dani et al.* ⁽⁴⁸⁾ ermittelten in einer Studie einen durchschnittlichen Alkoholkonsum von 397 ± 286 Gramm pro Tag, dagegen reichten nach *Cavallini et al.* ⁽⁴⁷⁾ bereits 136 ± 109 Gramm pro Tag. Die notwendigen Alkoholmengen, um eine chronische Pankreatitis als alkoholinduziert werten zu können, werden mit mehr als 50 ⁽⁵³⁾, 60 ⁽¹⁰⁾, 80 ^(15/41/47) und auch 150 ⁽²²⁾ Gramm pro Tag angegeben. Nach *Singer und Müller* beträgt die konsumierte Alkoholmenge praktisch immer mehr als 80 Gramm pro Tag ⁽¹⁶⁾. Ein unterer toxischer Schwellenwert lässt sich jedoch nicht angeben ^(41/49/50). Deshalb ist auch der regelmäßige Konsum kleiner Alkoholmengen nicht absolut risikofrei ^(16/21). Bei der alkoholischen Pankreatitis geht man, ebenso wie bei anderen alkoholassozierten Organschäden, von einer unterschiedlichen individuellen Empfindlichkeit aus ^(45/54), wobei die verantwortlichen Ursachen bisher unbekannt sind ⁽⁵¹⁾. Bei Frauen kann es im Vergleich zu Männern schon nach kürzerer Expositionszeit und deutlich geringerer Alkoholmenge zu einer chronischen Pankreatitis kommen ⁽¹⁶⁾. Nach *Glasbrenner und Adler* ⁽⁵⁰⁾ liegen die meisten Angaben der Schwellen des kritischen täglichen Alkoholkonsums für Frauen bei 20 bis 40 Gramm und für Männer bei 60 bis 80 Gramm bei einer Expositionsdauer von 5 bis 15 Jahren.

Die alkoholische chronische Pankreatitis kann auch nach Einstellen des Alkoholkonsums weiter fortschreiten, meist ist die Progression dann jedoch langsamer und weniger schwer ⁽⁵⁶⁾. Trotz der zahlreichen epidemiologischen Studien, die eine Korrelation zwischen Alkoholkonsum und Erkrankungsrisiko belegen, sind die pathophysiologischen Mechanismen weitgehend ungeklärt ^(57/20). So entwickeln nur etwa 5 Prozent der Alkoholiker eine klinisch manifeste Pankreatitis und nur etwa ein Prozent hat gleichzeitig eine Leberzirrhose, die ebenfalls zum überwiegenden Teil ethylisch bedingt ist ⁽⁸⁾. Untersuchungen zur Pathogenese werden dadurch erschwert, dass tierexperimentell auch exzessiver Alkoholkonsum alleine nicht ausreicht, um eine chronische Pankreatitis zu verursachen ⁽²⁰⁾. Es scheinen noch andere Kofaktoren notwendig zu sein, bevor sich eine alkoholische Pankreatitis manifestiert ^(20/16). Verschiedene Faktoren (z.B. hochkalorische Ernährung, Tabak, Genmutationen) wurden vorgeschlagen, es konnte jedoch keine einzelnen eindeutig etabliert werden ⁽⁵¹⁾.

1.6.2 Idiopathische chronische Pankreatitis

Bezüglich der idiopathischen chronischen Pankreatitis ist die zugrundeliegende Ursache, die zur entzündlichen Veränderung des Organes führt, nicht ersichtlich. Ein Teil der idiopathischen Pankreatitiden kann möglicherweise auf das Übersehen bekannter Ursachen, heimlichen Alkoholkonsum oder Hypersensitivität gegenüber geringeren Alkoholmengen zurückgeführt werden ⁽²¹⁾. Aufgrund von Unterschieden im Vergleich zur alkoholischen Pankreatitis hinsichtlich Epidemiologie ^(18/19), Histologie ⁽⁵⁸⁾ und Bildgebung ⁽⁵⁹⁾ gehen verschiedene Autoren ⁽⁶⁰⁾ jedoch davon aus, dass es sich bei der idiopathischen Pankreatitis um eine eigenständige Form handelt. *Lankisch et al.* ⁽⁶⁰⁾ fanden bei der idiopathischen Pankreatitis einen modifizierenden Einfluss von moderatem Alkoholkonsum (<50 g/d). Dieser führt zu einem früheren Erkrankungsbeginn, früheren Verkalkungen und häufigerem Schmerz und Komplikationen. Es wurden Assoziationen der idiopathischen chronischen Pankreatitis mit Gen-Mutationen im CFTR ("cystic fibrosis transmembrane conductance regulator") ^(61/62) und im pankreatischen sekretorischen Trypsininhibitor (PSTI, "serine protease inhibitor type Kazal 1", SPINK 1) ^(63/64) gefunden (siehe Genetische Prädispositionen). Als Sonderform der idiopathischen Pankreatitis stellt die tropische Pankreatitis die häufigste Form der chronischen Pankreatitis in Indien und anderen Ländern in Äquatornähe (Afrika, Asien, Brasilien) dar ⁽²²⁾. Die Ätiologie ist unbekannt, die überwiegend vorgeschlagenen Ernährungsfaktoren liefern keine ausreichende Erklärung ^(20/22).

1.6.3 Autoimmunpankreatitis (AiP)

Bereits in den 50er Jahren wurde eine Verbindung zwischen autoimmunen Erkrankungen (z.B. Colitis ulcerosa / Sjögren-Syndrom / Primär sklerosierende Cholangitis) und bestimmten Formen der chronischen Pankreatitis ohne erkennbaren Auslöser (idiopathische CP) vermutet ⁽⁶⁵⁾. Aber erst in den letzten 10 Jahren hat sich das Konzept der „Autoimmunpankreatitis“ als eigenständige Entität herausgebildet. Epidemiologische Daten bezüglich Prävalenz und Inzidenz sind bisher nicht verfügbar, da keine eindeutige Trennung der akuten Pankreatitis von der idiopathischen chronischen Pankreatitis definiert wurde. Histologisch ist die Autoimmunpankreatitis charakterisiert durch eine intensive Entzündungsreaktion mit konsekutiver obliterierender Fibrose bei vorrangig periduktaler Lokalisation. Die prädominierende Population der infiltrierenden Entzündungszellen stellen die CD4⁺-T-Lymphozyten dar, was eine Antigen-vermittelte zelluläre Autoimmunreaktion mit nachweisbarer Interferon- γ -(IFN- γ)-Produktion als pathogenetische Ursache vermuten lässt

⁽⁶⁵⁾. In bildgebenden Verfahren findet sich häufig ein entzündlich bedingter Pankreaskopftumor, der auch zu dem Verdacht auf ein Malignom führen kann. Die Diagnose wird dann erst postoperativ gestellt. Aufgrund des Fehlens eindeutiger Kriterien ist die klinische Differentialdiagnose zu anderen Pankreatitisformen und Neoplasien schwierig. Das empfohlene diagnostische Vorgehen basiert auf der Kombination von (1) Bildgebung, IgG4-Serumspiegel (wird aber kontrovers diskutiert), Histologie / Zytologie, (2) Assoziation mit anderen Autoimmunerkrankungen und (3) Besserung nach Steroid-Therapie. Mögliche Gangobstruktionen mit konsekutivem Ikterus werden mittels Stent-Drainage therapiert. Bei zweifelsfreier Diagnose wird normalerweise kein operatives Vorgehen benötigt ⁽⁶⁵⁾.

1.7 Pathogenese

Ein wesentliches Merkmal der persistierenden Entzündungsreaktion im Pankreas ist die Entwicklung einer extremen Organfibrose. Da die pathogenetischen Mechanismen bis heute nicht vollständig geklärt sind, konnten bisher keine wirksamen therapeutischen Konzepte zur Verhinderung bzw. Beseitigung der Bindegewebsablagerungen entwickelt werden. Untersuchungen zur Pathogenese der chronischen Pankreatitis sind aus diesem Grund Gegenstand zahlreicher Forschungsprojekte. Auf der Grundlage verschiedener experimenteller Ergebnisse wurden in den vergangenen Jahrzehnten mehrere hypothetische Modelle zur Beschreibung der Entstehung einer chronischen Pankreatitis entwickelt.

1.7.1 Obstruktionstheorie (Sarles)

Bei der chronischen Pankreatitis kommt es durch das Einwirken einer Noxe zu einer Veränderung der Zusammensetzung des Pankreas-Sekrets. Eine erhöhte Sekretion von Eiweiß ⁽¹⁰⁰⁾, bei einer verminderten Flüssigkeits-Sekretion durch die Azinuszellen führt zur Präzipitation von Eiweiß-Pfropfen in den kleinen und kleinsten Pankreasgängen sowie den Lumina der Azini ⁽⁶⁶⁾. Diese Okklusion der kleinsten Pankreasgänge führt zu einer chronischen Entzündung der Drüse, die einhergeht mit Parenchym-Untergang und Bindegewebs-Ersatz. Ein wichtiges Pankreasprotein, was hierbei eine Rolle spielt, ist das „Pankreassteinprotein“ Lithostatin ⁽¹⁰¹⁾. Es verhindert sowohl die Bildung als auch das Wachstum von Calciumcarbonat-Kristallen, und wird bei Alkoholkonsum vermindert sezerniert. Dies würde die Bildung von Calciumsteinen in den Proteinplugs begünstigen oder hervorrufen.

1.7.2 Toxisch-metabolische Theorie (Bordalo)

Alkohol schädigt die Pankreas-Azinus-Zellen direkt oder über seine Metabolite aus der Leber (z.B. Acetaldehyd). Akkumulation von Fett in den Azinuszellen und dem interstitiellen Gewebe ist das erste morphologische Zeichen einer Pankreasschädigung durch chronischen Alkoholismus ⁽⁹⁶⁾. Bei fortschreitendem Alkoholabusus kommt es zur Zellnekrose, Fibrosebildung und schließlich zur Sekretionsminderung.

1.7.3 Detoxifikationstheorie (Braganza)

Die chronische Pankreatitis ist die Folge einer gestörten hepatischen „Detoxifikation“ bestimmter Fremdstoffe. Es kommt zu Enzym-Konversionen wie z.B. Xanthindehydrogenase in Xanthinoxidase ⁽⁹⁷⁾. Dieses Enzym bildet gewebstoxische Sauerstoffradikale, die falls nicht neutralisiert, die Zellmembranen zerstören. Freigesetzte Verdauungsenzyme im Interstitium lösen eine Entzündungsreaktion aus, was zur Infiltration von immunkompetenten Zellen und zur Komplementsystem-Aktivierung führt. Dazu passend, wurde durch die Behandlung mit Superoxid-Dismutase (SOD) und Katalase-Enzymen eine Verbesserung der ultrastrukturellen Veränderungen erreicht ⁽¹¹⁸⁾.

1.7.4 Nekrose-Fibrose-Theorie (Klöppel)

Ausgegangen wird von der histopathologischen Beobachtung, dass bei alkoholischen Pankreatitiden interstitielle Nekrosen und chronisch-fibrotische Veränderungen nebeneinander existieren, die zu einer chronischen Entzündung führen können. Hierbei induzieren interstitielle Fettgewebstekrosen und Hämorrhagien eine perilobuläre Fibrosebildung, die eine Abflussbehinderung von Pankreas-Sekret aus den Azini bewirkt. In den verengten und erweiterten interlobulären Gängen kommt es zu einer Bildung von Proteinplugs (s.o. Obstruktionstheorie) und zur retrograden Aufstauung des proteinreichen Sekrets ⁽⁹⁹⁾. Die Folge ist ein Zugrunde-Gehen der Azinuszellen und die Ausbildung der klassischen fibrotischen Veränderungen der chronischen Pankreatitis.

Alle oben genannten Hypothesen erklären die Fibrosierung als eine Folge und Ersatz von zerstörtem Parenchym. Inzwischen wurden die pankreatischen Sternzellen (PSZ) als Hauptproduzenten der Extrazellulärmatrix identifiziert ^(131/132). Leukozyten spielten dabei nur im Rahmen der unspezifischen Entzündung eine Rolle. Die Ergebnisse v.a. zur Klärung der Entität der Autoimmunpankreatitis (AiP) konnten zeigen, dass immunkompetente Zellen (v.a. CD4⁺-T-Lymphozyten) über die Aktivierung von PSZ an der Synthese und Ablagerung

des Bindegewebes maßgeblich beteiligt sind ⁽¹³³⁾. Die Effekte werden dabei von löslichen Mediatoren, insbesondere Zytokine, sowie von zellulären Mechanismen, z.B. Zytotoxizität, vermittelt ^(102 / 65).

1.8 Tiermodelle der chronischen Pankreatitis

Versuche und Studien zur Ätiologie, Pathogenese und Therapie der chronischen Pankreatitis sind durch die limitierte Verfügbarkeit von adäquatem menschlichem Organ-Gewebe sehr schwierig. Das per Operation infolge von Komplikationen gewonnene Material stellt größtenteils ein Endstadium des Krankheitsverlaufes dar, in dem keine zellbiologischen und molekularen Untersuchungen zu den Mechanismen der Entstehung der Organveränderungen mehr möglich sind.

Aus diesem Grund wurden mehrere Tiermodelle zur Erforschung dieser Sachverhalte etabliert. Einige Modelle bedürfen komplexer experimenteller Methoden (chirurgische Intervention / chemisch-toxische Reaktion), andere wiederum eine Vorlaufzeit von zum Teil >16 Wochen bis zur Entwicklung von irreversiblen chronischen Organveränderungen. Aufgrund der großen Anzahl von Tiermodellen und der damit verbundenen Vielzahl von Varianten der einzelnen Modelle (chronische Alkohol-Administration / Stress) werden hier nur die am weitesten verbreiteten Modelle beschrieben. Zusätzlich ist innerhalb der experimentellen Modelle auch eine teilweise große Varianz der Ausprägung der Veränderungen vorhanden.

1.8.1 WBN/Kob Ratte mit spontaner Pankreatitis

Dieser Stamm Wistar-Ratten wurde als sich spontan entwickelndes Diabetes-Modell etabliert und zeigt entsprechende Charakteristika:

1. Hyperglykämie, Glukosurie, Hypoinsulinämie ab einem Alter von 9-12 Monaten,
2. Diabetes-Symptome treten nur bei männlichen Tieren auf,
3. Auftreten nur in nicht-fettleibigen Ratten,
4. verminderte Anzahl von Inselzellen, begleitet von einer exokrinen Insuffizienz.

Im Gegensatz zu anderen Diabetes-Modellen ist die Ursache der Symptome bei diesem Ratten-Stamm auf die Entwicklung einer chronischen Pankreatitis zurückzuführen. Hierbei wurden 4 Wochen alte Tiere (Gewicht ca. 80 g) mit einer speziellen protein- und fettreichen Diät (MB-3) gefüttert, was die Entwicklung einer chronischen Pankreatitis beschleunigt ^(67/68). Die Ätiologie der Entwicklung der Pankreas-Organveränderungen ist ungeklärt. Nachweisbar sind periduktale Fibrose, Infiltration mit Entzündungszellen, interstitielles

Ödem und erhöhte Expression inflammatorischer Zytokine ⁽⁶⁹⁾. Im weiteren Verlauf kommt es zu Unregelmäßigkeiten und Aufweitung des Pankreasganges, die histologisch begleitet werden von inter- und intralobulärer Fibrose und irregulärer Destruktion des Parenchyms. Desweiteren sind eine Hyperplasie des duktales Epithels und Degeneration der Azinuszellen nachweisbar.

Nach Woche 16 wird ein Rückgang der Organveränderungen, jedoch keine restitutio ad integrum berichtet, weshalb dieses Modell als „transientes Pankreatitis-Modell“ bezeichnet werden könnte. Die hervorgerufenen Veränderungen und der Verlauf sind geringfügig anders als die Veränderungen bei der humanen chronischen Pankreatitis. Die hierfür ursächlichen Mechanismen sind bisher noch unbekannt. Darüber hinaus besteht nur eine eingeschränkte Verfügbarkeit dieser Tiere, da sie von kommerziellen Züchtern nicht zur Zucht abgegeben werden.

1.8.2 Cerulein

In diesem Modell wird über Nacht nüchtern gehaltenen Sprague-Dawley-Ratten mit einem Körpergewicht von 300-500 g und einem Alter von 10 Wochen Cerulein 2 x 20 µg/kg intraperitoneal (i.p.) injiziert. Diese Injektionen erfolgen 4-malig in einem Intervall von zunächst einer Stunde. Hierdurch kann eine akute Pankreatitis ausgelöst werden ⁽⁷⁰⁾.

Durch wöchentliche Wiederholung der Injektionen in 5 aufeinanderfolgenden Wochen konnte eine chronische Pankreasveränderung nachgewiesen werden ⁽⁷¹⁾. Zusätzlich zu diesem Vorgehen wird dieses Modell z.T. kombiniert mit Alkohol-Diät oder Stress (z.B. Eintauchen in Wasser bis zum Xiphoid über 5 Stunden). Trotzdem führt dieses Modell lediglich zu einer moderaten Schädigung des Organs mit nur geringer Fibrose-Bildung. Weiter verbreitet ist das Modell im Einsatz in der Maus, allerdings aber mit einem abgewandelten Versuchsprotokoll⁽¹³⁴⁾.

1.8.3 2,4,6-Trinitrobenzensulfonsäure (TNBS)

Dieses Modell basiert auf eine Instillation von TNBS in den Pankreasgang von narkotisierten Sprague-Dawley-Ratten (Körpergewicht 300-350 g). Zunächst wird operativ das Duodenum eröffnet und die Papille kanüliert. Nach 15 Minuten freier bilio-pankreatischer Sekretion wird lebernah der Gang ligiert, um direkte Leberschäden zu vermeiden. Mit einem maximalen intraduktalen Druck von 20 cm H₂O wird dann 2%-iges TNBS retrograd in den Gang infundiert. Nach einer Inkubationszeit von 60 Minuten erfolgt eine Auswaschphase von 30 Minuten. Danach werden die Ligaturen entfernt und das

Duodenum und die Bauchdecke chirurgisch verschlossen ⁽⁷²⁾. Zunächst führt diese Vorgehensweise zu einer schweren akuten nekrotisierenden Pankreatitis mit einer Mortalität von ~30 %. Mittels dieser Methode kann nach frühestens 3 Wochen eine chronische inflammatorische Reaktion im Pankreas nachgewiesen werden, die durch periduktale und lobuläre Fibrose, Gangstenosen, Entzündungszellinfiltration und Zeichen der Drüsenatrophie charakterisiert ist. Als Mechanismen die zur Schädigung des Organs führen, werden eine immunologisch vermittelte sowie eine direkt toxische Reaktion diskutiert. Hierbei handelt es sich um ein sehr aufwändiges und v.a. invasives Modell, das den Versuchstieren im Vergleich zu anderen Modellen deutlich mehr Stress zumutet.

1.8.4 Alkohol-Fütterung

Männliche Wistar-Ratten wurden mit 20% Alkohol ad libitum über eine Periode von 20-30 Monaten gefüttert. 50 % der Tiere entwickelten eine Protein-Plug im Pankreasgang mit Sklerose des Pankreas und Azinuszelluntergang. Teilweise konnte ebenfalls eine periduktale Fibrose nachgewiesen werden ^(73/74). Die Veränderungen konnten in anderen Versuchen jedoch nicht reproduziert werden. Aus diesem Grund ist das Modell der Alkohol-Fütterung nur noch ein Ko-Faktor zu weiteren Modellen der Pankreasschädigung ⁽⁷⁵⁾. Der dann angewendete isokalorische Ersatz von max. 40 % der Kohlenhydrat-Kalorien durch Ethanol wird auch als LieberDeCarli-Diät bezeichnet ⁽⁷⁴⁾.

1.8.5 TGF- β 1-transgene Mäuse

Dieses transgene Maus-Modell ist durch eine selektiv im Pankreasgewebe nachweisbare TGF- β 1-Überexpression unter Kontrolle eines Ratten-Insulin-II-Gen-Promotors charakterisiert. Die Tiere zeigen eine gesteigerte Proliferation von Fibroblasten und vermehrte Produktion von Extrazellulärmatrix (EZM), v.a. Kollagen Typ I und III ⁽⁷⁶⁾.

Der Beginn dieser Veränderung ist bereits 14 Tage nach Geburt nachweisbar. In einem Alter von 330 Tagen ist annähernd das komplette endokrine Gewebe durch Bindegewebe ersetzt. Dieses Modell ist v.a. geeignet zum Studium der Genese der Pankreasfibrose. Immunologische Untersuchungen sind an diesem Modell aufgrund der nicht vorhandenen Zellinfiltration nicht möglich und lassen einen anderen Pathomechanismus als inflammatorische Ursachen vermuten.

1.8.6 Operative Gang-Ligatur / Closed duodenal Loop (CDL)

Durch die chirurgische Ligatur des Pankreasganges bei Nagetieren führt zu einer Pankreasatrophie und einer Apoptose von Azinuszellen und Gangepithel. Diese Methode bewirkt jedoch keine stärkere Entzündungsreaktion oder Nekrose, weshalb es bisher zum Studium der Regeneration des exokrinen Pankreasgewebes angewendet wurde. Eine Ausnahme stellt das amerikanische Opossum dar. Dieses Tier hat einen anatomisch sehr langen Pankreas-Gallengang. Nach Ligatur dieses Ganges bildet das Tier eine akute nekrotisierende Pankreatitis aus, die sich im weiteren Verlauf zu einer Azinuszellatrophie und exokrinen Pankreasinsuffizienz entwickelt ⁽⁷⁷⁾.

Oberhalb und unterhalb der Papille wird bei der „closed duodenal loop“-Methode (CDL) eine Ligatur angelegt ⁽⁷⁸⁾. Nachteile ergeben sich hier aus der operativen Maßnahme, den unphysiologischen Druckverhältnissen und der Unsicherheit des Einflusses bakterieller Infektionen.

1.8.7 MHC-II knock-out Mäuse

Bei MHC-II-defizienten Mäusen wurde infolge der genetischen Veränderung der Antigenprozessierung ein systemisches Überwiegen der MHC-I-vermittelten Reaktionen beobachtet. Die damit verbundene vorrangige Aktivierung von CD8⁺-T-Lymphozyten führte bei den Tieren zu einer Entzündungsreaktion mit Organveränderungen im Sinne einer chronischen Pankreatitis ⁽⁷⁹⁾. Obwohl die Pathohistomorphologie mit Atrophie und Lipomatose nicht dem menschlichen Krankheitsbild entsprach, kann die zielgerichtete Wirkung von CD8⁺-Zellen auf das Pankreasgewebe im Sinne spezifischer Interaktionen zwischen der CD8⁺-Subpopulation und bisher nicht definierten Zellen des Pankreas interpretiert werden.

1.8.8 Dibutyl-Zinn-Dichlorid (DBTC)

Das Dibutyl-Zinn-Dichlorid-(DBTC)-Rattenmodell wurde von *Merkord et al.* ⁽¹⁰⁴⁾ entwickelt. Vorteile des Modells sind die nur gering-invasive Applikationsform und die Steuerbarkeit des Entzündungsverlaufs.

Eine akute Entzündungsreaktion wurde durch die einmalige i.v.-Applikation von 4 mg DBTC/kg KG in die seitliche Schwanzvene induziert. Dies führte zu einer akuten ödematösen Pankreatitis (aP), die nach ca. 14 Tagen folgenlos im Sinne einer restitutio ad integrum, ohne Pankreas-Gangstauung abheilt ⁽⁸⁰⁾.

Ebenso wurde durch die i.v.-Injektion von 8 mg DBTC/kg KG eine chronische Pankreatitis (cP) hervorgerufen ⁽⁸⁹⁾. Im Gegensatz zu der akuten Verlaufsform bildet sich die anfängliche Entzündungsreaktion mit interstitiellem Ödem, Zellinfiltration und Anstieg der Pankreasenzyme im Serum nicht zurück, sondern nimmt einen chronischen Verlauf an. Neben der persistierenden Zellinfiltration imponiert histomorphologisch eine nach ca. 14 Tagen beginnende Organfibrosierung, die innerhalb der folgenden Wochen zu einem ausgedehnten bindegewebigen Umbau des Parenchyms führt. Damit verbunden sind Obstruktion und Dilatation des Gangsystems. Zusammenfassend, weist dieses Tiermodell der chronischen Pankreatitis wesentliche Merkmale des menschlichen Krankheitsbildes auf. Das Modell bietet so ideale Voraussetzungen zur Untersuchung molekularer zellbiologischer sowie immunologischer Parameter im Verlauf von akuter und chronischer Pankreatitis ^(81/89).

In weiterführenden Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass aktivierte Th1-Lymphozyten entscheidend an der Pathogenese des chronischen Verlaufs der DBTC-induzierten Entzündungsreaktion beteiligt sind ⁽⁸¹⁾. Auf diesen Ergebnissen basieren die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit.

1.9 Problemstellung

Aktuelle Daten weisen darauf hin, dass immunologische Mechanismen nicht nur an der Pathogenese der seltenen autoimmunen Pankreatitis beteiligt sind, sondern auch bei häufigeren Verlaufsformen der CP eine Rolle in der Krankheitsprogression spielen. So konnten in Gewebeproben von Patienten mit alkoholischer chronischer Pankreatitis erhöhte Zahlen CD4- sowie CD8-positiver Lymphozyten nachgewiesen werden, wobei sich eine Dominanz der CD8⁺-T-Zellen zeigte ⁽¹⁰⁸⁾. Die Infiltration war hauptsächlich periduktal zu verzeichnen, weswegen eine Beteiligung von immunkompetenten Zellen bei der Entstehung der extrazellulären Matrix angenommen wird. V.a. autoreaktive zytotoxische T-Lymphozyten (CD8⁺) sind Mitverursacher der Zerstörung von Azinus- und Gangzellen ⁽⁹³⁾, die durch das Vorhandensein von Antigenen aktiviert werden. Diese Mechanismen sind auch im Modell der chronischen DBTC-Pankreatitis nachvollziehbar. Vorversuche deuten darauf hin, dass aktivierte T-Zellen maßgeblich an der Persistenz der Entzündungsreaktion und somit der Fibrogenese im Rahmen der DBTC-Pankreatitis beteiligt sind.

Das Ziel dieser Arbeit war es, zu überprüfen, ob es im Verlauf der durch DBTC induzierten chronischen Pankreatitis zu einer Antigen-spezifische Aktivierung von T-Lymphozyten

kommt. Diese sensibilisierten Lymphozyten sollten in der Lage sein, das Krankheitsbild nach Transfer in einem anderen Tier zu induzieren.

Zur Überprüfung dieser These wurden mononukleäre Leukozyten von Ratten mit chronischer Pankreatitis Tieren mit einer leichten Pankreasvorschädigung injiziert und der weitere Verlauf der Pankreatitis analysiert.

Die Beteiligung immunologischer Prozesse an der Pathogenese der chronischen Pankreatitis sollte damit belegt werden. Weiterführende Arbeiten zielten darauf ab, die Mechanismen der spezifischen Immunreaktion im Rahmen der DBTC-Pankreatitis näher zu analysieren. Hierzu wurden u.a. die Zusammensetzung der Immunzellinfiltrate und die Expression proinflammatorischer Zytokine analysiert.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere und Haltung

Die geplanten Tierversuche wurde von den Tierschutzbeauftragten der Universität Rostock und vom Amt f. Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei des Landes Mecklenburg-Vorpommern genehmigt. Für die Durchführung der Versuche wurden männliche LEWIS-1W Inzucht-Ratten (LEW.1W) aus Karlsburg (Deutschland) verwendet [Körpergewicht (KG) = 160-200 g]. Die Haltung erfolgte jeweils paarweise in Drahtkäfigen (Macrolon EBECO Typ IV (Macrolon, Castrop-Rauxel, Deutschland)) in einem klimatisierten (22-23°C) Raum, mit einem 12 h Tag und 12 h Nachtrhythmus. Die Tiere erhielten jeden zweiten Tag frischen Einstreu sowie Standard-Nagetier-Futter und Wasser ad libitum.

2.2 Modell der DBTC-Pankreatitis

Das Dibutyl-Zinn-Dichlorid (DBTC) (**Abb. 4**) wurde in einer Konzentration von 0,1 g/ml als Stammlösung in Ethanol reinst (96%) gelöst. Die entsprechende Menge dieser Stammlösung wurde dann zusammen mit 2 Teilen Ethanol und 3 Teilen Glycerin vermischt, so dass pro Tier ein Volumen von 250 µl appliziert wurde. Die Applikation erfolgte unter Aether-Kurznarkose in die Schwanz-Vene des Tieres.

Die akute Pankreatitis (aP) wurde durch die i.v.-Applikation von 4 mg DBTC/kg Körpergewicht in die Schwanzvene induziert. Ebenso wurde durch die i.v.-Injektion von 8 mg DBTC/kg KG eine chronische Pankreatitis (cP) hervorgerufen.

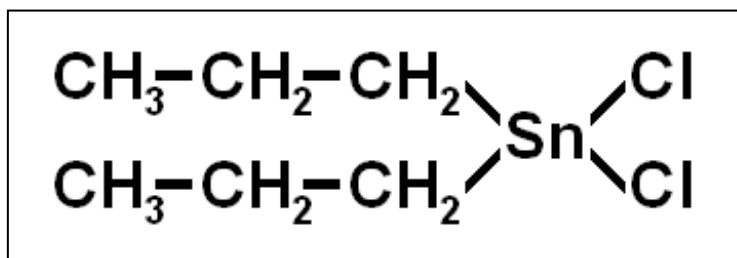


Abb. 4: Chemische Struktur des Dibutyl-Zinn-Dichlorid (DBTC)

2.2.1 Chemikalien

- Dibutyl-Zinn-Dichlorid (DBTC) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland).
- Ethanol reinst (96%) (Zentralapotheke Universität Rostock, Rostock, Deutschland).
- Glycerin (ca. 99 %) C₃H₈O₃ (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland).

2.3 Methoden

2.3.1 Gewinnung der Organe

2.3.1.1 Narkose

Die Versuchstiere wurden zunächst für ungefähr 1 Minute in einen 10-Liter-Glasbehälter gefüllt mit Ether-getränkten Zellstoff-Tüchern narkotisiert. Nach der Herausnahme wurde mit einer Mull-Kompresse das Maul trockengewischt, um Aspirationen zu vermeiden. Auch während der Operation atmeten die Tiere Ethergas aus einem 50 ml Erlenmeierkolben. Die Steuerung und Überwachung der Narkose-Tiefe erfolgte durch die Tierpflegerin.

2.3.1.2 Organ-Entnahme

Die Organe und das Blut wurden folgendermaßen präpariert: Zunächst wurde im unteren abdominalen Bereich in der Mittellinie die Oberhaut durchtrennt und der Schnitt bis über das Sternum fortgeführt. Danach wurde die Muskulatur der Bauchdecke von caudal nach cranial durchtrennt und ebenfalls der Thorax eröffnet. Mit einem Thoraxspreizer wurde der Brustkorb offengehalten, so dass ein offener Zugang zum Herzen entstand. Der Schnitt durch die Bauchdecke wurde seitlich erweitert, damit auch der Inhalt der Bauchhöhle frei zugänglich wurde. Anschließend wurde mit einer EDTA-Monovette und einer Kanüle das Blut aus dem Herzen abgezogen. Mit der so entstandenen relativen Blutleere konnten Einblutungen und damit Beeinträchtigungen der Übersichtlichkeit verhindert werden. Da das Pankreas aufgrund seines Enzymreichtums vor Abbauvorgängen besonders geschützt werden muss, wurde es sofort entnommen, durch die Zugabe von Tissue-Tek® fixiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Danach erfolgte die Entnahme der dorsal des Pankreas gelegenen Lymphknoten, anschließend die Lymphknoten im Mesenterial-Ansatz. Bis zur weiteren Aufarbeitung wurden die Lymphknoten in Heparin-haltigen PBS-Puffer aufbewahrt. Zum Schluss wurde die Milz exstirpiert und in RPMI 1640 Zellmedium aufgenommen.

2.3.2 Isolation der Lymphozyten

2.3.2.1 Isolation der Blut-Lymphozyten (PBMC)

Das Blut wurde durch Herzpunktion gewonnen. Ungefähr 9 ml Blut wurden in einer EDTA-Monovette aufgenommen. Dieses Blut wurde dann mit 2 Teilen PBS-Puffer verdünnt und 7 ml Histopaque (1,083 g/l) damit überschichtet. Diese Dichte-Gradient-Zentrifugation wurde für 25 Minuten bei 2000 rpm und ohne Bremse durchgeführt. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und zur Serum-Analyse von Amylase und Lipase eingefroren.

(Verdünnung 1:3). Der entstandene Lymphozytenring (= „buffy coat“) wurde vorsichtig mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze abpipettiert. Danach wurde 2 mal mit PBS-Puffer bei 1400 rpm und 20 Minuten gewaschen. Anschließend wurde das Zellpellet in 5 ml Medium (RPMI 1640 + 10% FKS + 1% Penicillin/Streptomycin) aufgenommen und ein Teil der Zellen in einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer gezählt und anschließend die Gesamtzahl berechnet. Tote Zellen wurden durch Aufnahme von Trypanblau identifiziert. Aus dem Blut wurden im Durchschnitt 30-50 Millionen mononukleäre Zellen gewonnen.

2.3.2.2 Isolation der Lymphknoten-Lymphozyten (LNC)

Die Lymphknoten wurden aus dem Mesenterium und dem Retroperitonealraum entnommen und in 5 ml RPMI 1640 Zellkultur-Medium + 10 I.E. Heparin aufgenommen. Anschließend wurden sie mittels steriler Schere und Pinzette zerkleinert und vorsichtig mit einem sterilen 20 ml-Spritzenstempel durch ein 70 µm Zellsieb (cell strainer, Falcon, Becton Dickinson, New Jersey, USA) gedrückt und mit 30 ml PBS-Puffer nachgespült. Die sich ergebende Zell-Suspension wurde bei 2000 rpm und 25 Minuten abzentrifugiert und anschließend noch einmal mit PBS-Puffer und 2000 rpm / 25 Minuten gewaschen. Danach wurde das Pellet in 5 ml Zellkulturmedium (RPMI 1640) aufgenommen. Die Zählung erfolgte ebenfalls nach Zusatz von Trypanblau in einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer. Die Lymphknoten enthielten im Durchschnitt 300-600 Millionen Lymphozyten.

2.3.2.3 Isolation der Milz-Lymphozyten (SMC)

Die Milz wurde nach der Entnahme in 5 ml Zellkulturmedium (RPMI 2) aufbewahrt. Mit steriler Schere und Pinzette wurde das Organ zerkleinert und durch ein 60 µm Metall-Sieb gepresst, anschließend mit PBS-Puffer 20 Minuten bei 2000 rpm gewaschen. Die isolierten Milz-Zellen wurden dann 10 Minuten mit NH_4Cl (0,25 M) in der Dunkelkammer inkubiert, wodurch die Erythrozyten lysiert wurden. Im Anschluss daran wurde erneut zentrifugiert (1400 rpm für 10 Minuten bei 20°C) und 2 mal mit PBS-Puffer gewaschen. Das sich ergebende Pellet wurde dann in 5 ml Zellkulturmedium aufgenommen und die Zellzahl anschließend in der Fuchs-Rosenthal-Zählkammer bestimmt. In den Milz-Organen waren im Durchschnitt 500-900 Millionen Lymphozyten enthalten.

2.3.2.4 Chemikalien

- Tissue-Tek®, O.C.T.™ Compound , Sakura, Staufen, Deutschland.

- Histopaque-1083, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA mit einer Dichte von 1,0853 g/ml zur Dichte-Gradient-Zentrifugation der Blut-Lymphozyten.
- PBS-Puffer (dampfsterilisiert): pH-Wert 7,4, NaCl 8 g/l, KCl 0,2 g/l, Dinatriumhydrogenphosphat-2H₂O 1,44 g/l, Kaliumhydrogenphosphat 0,24 g Zentralapotheke, Universität Rostock, Rostock, Deutschland.
- RPMI 1640 Zell-Kulturmedium versetzt mit 10% Fetalem Kälberserum (FKS) und 1% Penicillin / Streptomycin von Biochrom, Berlin, Deutschland.
- Fetales Kälberserum (FKS) von Biochrom, Berlin, Deutschland.
- Trypanblau 0,4% von GibcoBRL, Life Technologie, Grand Island, NY, USA wurde benötigt zur Färbung der Mononukleären Zellen vor dem Färben in der Fuchs-Rosenthal-Zählkammer.
- Heparin, Liquemin® N 25000, Hoffmann-LaRoche AG, Grenzach-Wyhlen, BRD.
- Mit Ammoniumchlorid-(NH₄Cl)-Lösung wurden die Erythrozyten zur Lyse gebracht. Die Konzentration beträgt 0,25 mol/l. Die Lösung wurde angefertigt und dampfsterilisiert von Zentralapotheke, Universität Rostock, Rostock, Deutschland.

2.3.3 Zählung der isolierten Lymphozyten

Zum Zählen wurden 50 µl Zellsuspension mit 50 µl Trypanblau und 100 µl PBS-Puffer vermischt. Diese 1:4 Verdünnung wurde dann in eine Fuchs-Rosenthal-Zählkammer gegeben. Zur Auszählung kamen 4 mal 4x4 Kästchen mit jeweils 2 Rändern (**Abb. 5**). Der gebildete Mittelwert wurde dann mit dem Faktor 4 multipliziert, da mit einer 1:4 Verdünnung gearbeitet wurde. Anschließend erfolgte die Multiplikation mit 5000, dem spezifischen Wert für diese Kammer. Zum Schluss wurde noch mit 5 multipliziert, je nach dem in welcher Volumen die Zellen aufgenommen wurden. So erhielt man die Zellzahl pro ml.

$$\text{Zellzahl} = \text{MW} \times 4 \times 5000 (\times 5)$$

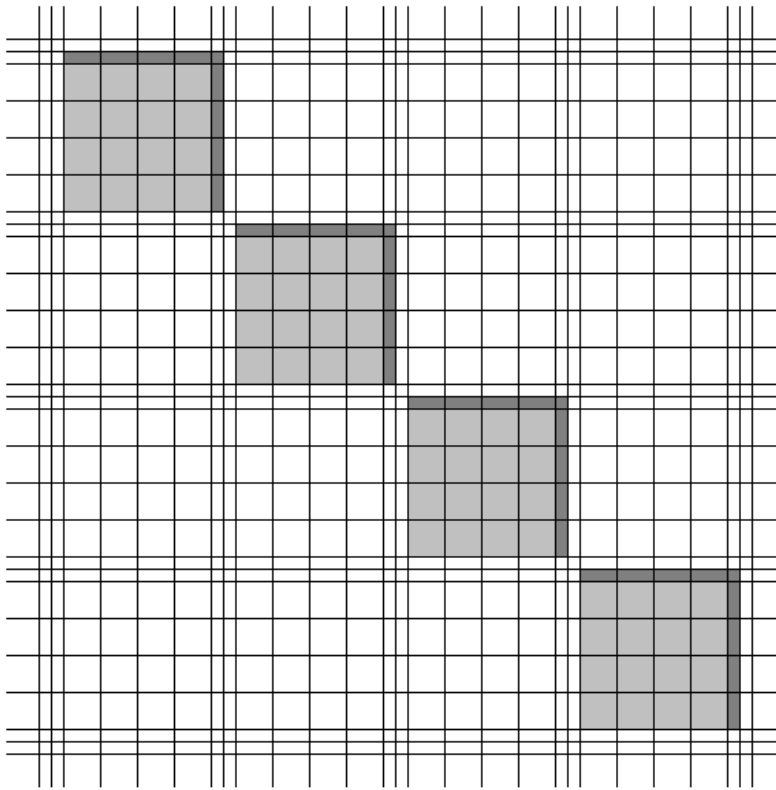


Abb. 5:
Fuchs-Rosenthal-
Zählkammer

2.3.4 Methode des Lymphozytentransfer

Für den Lymphozytentransfer wurde zunächst in Ratten eine chronische Pankreatitis, durch i.v.-Injektion von 8 mg DBTC/kg KG, induziert. Wiesen die Tiere nach 28 Tagen Zeichen einer chronischen Pankreatitis auf, z.B. Pankreasgangstauung, makroskopische Organdestruktion usw., wurden Blut, Milz und Lymphknoten entnommen. Anschließend wurden die Lymphozyten wie oben beschrieben isoliert. Der Lymphozytentransfer erfolgte mit insgesamt 8×10^8 mononukleären Zellen. Die Aufteilung wurde folgendermaßen vorgenommen: 60 % SMC, 30 % LNC, 10 % PBMC. Aufgenommen in 1 ml PBS-Puffer wurde diese Zellsuspension in die Schwanzvene der Ratte injiziert. Hierzu wurde das Versuchstier ebenfalls kurzzeitig mit Ether narkotisiert. Die Versuchstiere mit akuter Pankreatitis erhielten mononukleäre Zellen von Tieren mit chronischer Pankreatitis (**aP*+LT***) (**Abb. 6**).

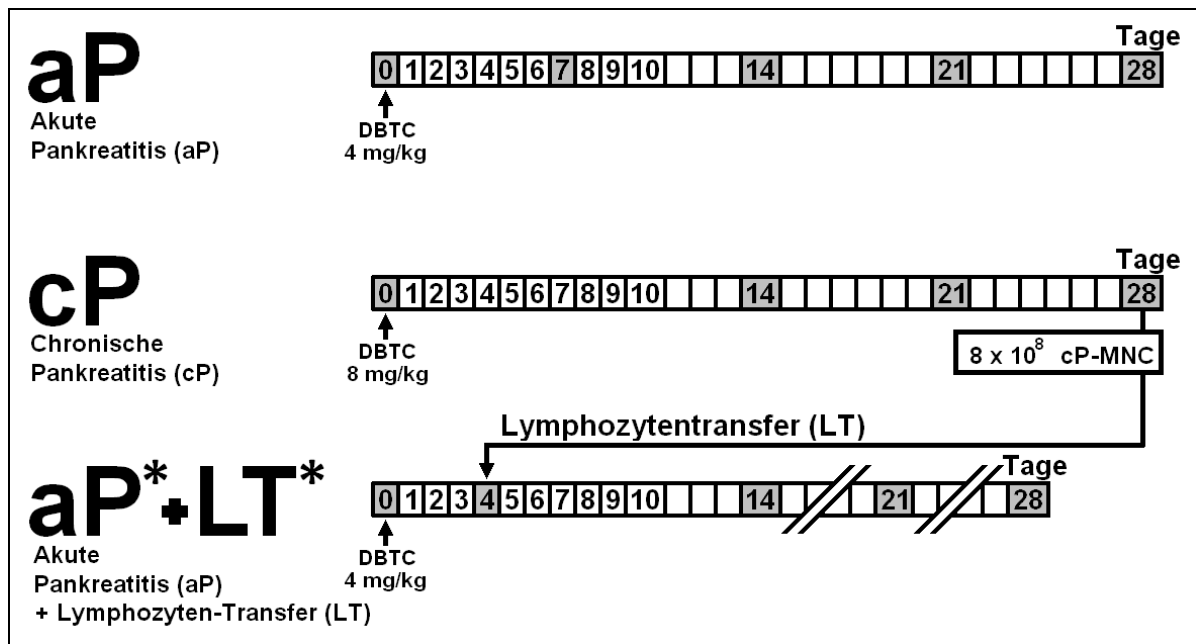


Abb. 6: Versuchsdesign des Lymphozyten-Transfers (LT): durch eine definierte Menge Dibutyl-Zinn-Dichlorid (DBTC) wurde eine chronische Pankreatitis (8 mg DBTC/kg KG → cP) induziert. An Tag 28 wurde aus diesen Tieren die mononukleären Zellen aus Blut, Milz und abdominalen Lymphknoten extrahiert und auf Ratten mit einer akuten Pankreatitis (4 mg DBTC/kg KG → aP) transferiert (aP*+LT*). Anschließend wurden die Tiere zu den Beobachtungszeitpunkten Tag 14, 21 und 28 getötet und die Veränderungen zum normalen Verlauf der akuten Pankreatitis (aP) dokumentiert.

2.3.4.1 Kontrollen

Zur Kontrolle der durch den Lymphozytentransfer hervorgerufenen Effekte wurden zum einen mononukleäre Zellen gesunder Tiere in Tiere mit akuter Pankreatitis (**aP+LT-0**) und zum anderen von Tieren mit chronischer Pankreatitis auf gesunde Tiere (**0-LT**) übertragen (**Abb. 7**).

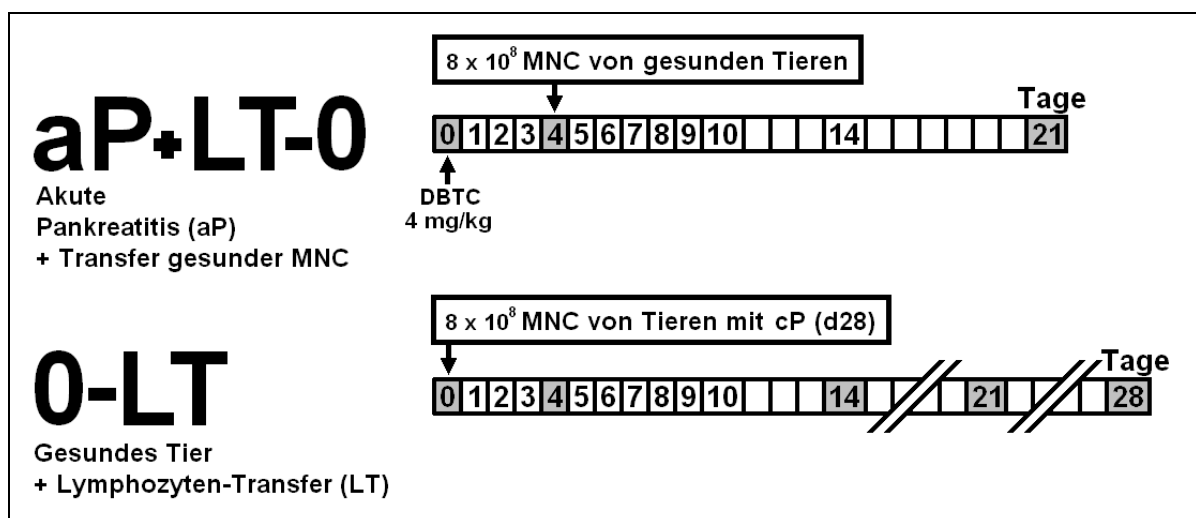


Abb. 7: Versuchsdesign: Kontrollen zu den Lymphozyten-Transfer-Versuchen: In Tiere mit einer akuten Pankreatitis (4 mg DBTC/kg KG → aP) wurden an Tag 4 mononukleäre Zellen

(MNC) von gesunden Tieren transferiert (**aP+LT-0**). Diese Tiere wurden zum Beobachtungszeitpunkt Tag 21 getötet und die Veränderungen dokumentiert. In der zweiten Kontrollgruppe (**0-LT**) erhielten gesunde Ratten mononukleäre Zellen (MNC) von Ratten mit einer chronischen Pankreatitis (8 mg DBTC/kg KG → **cP**). Diese Tiere wurden an den Beobachtungstagen 14, 21 und 28 getötet und die Veränderungen dokumentiert.

2.3.5 Nachweis von Pankreasenzymen im Serum

2.3.5.1 α -Amylase-Werte

Die Bestimmung der Amylase-Werte im Serum wurde mittels eines spezifischen Amylase-Test-Kits der Firma Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Deutschland) durchgeführt. Hierbei handelt es sich um einen enzymatischen Farbttest. Diese kinetische Methode beruht auf der Spaltung von 4,6-Ethyliden-(G₇)-1,4-nitro-phenyl-(G₁)- α ,D-Maltoheptaosid (Ethylidene Protected Substrate = EPS) durch α -Amylase und die nachfolgende Hydrolyse aller Spaltprodukte mit Hilfe der α -Glucosidase zu p-Nitrophenol. Die Farbintensität des gebildeten p-Nitrophenols, direkt proportional der α -Amylase-Aktivität, wird photometrisch gemessen. Die Messung erfolgte mittels des EPOS 5060 Analyser (Fa. Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Diese Untersuchungen erfolgten im Routinelabor der klinischen Chemie der Universität Rostock.

2.3.5.2 Lipase-Werte

Die Bestimmung der Lipase-Werte im Serum wurde mittels eines spezifischen Lipase-Test-Kits der Firma Roche Diagnostics GmbH durchgeführt. Diese Methode beruht auf der Spaltung eines mit Gallensäuren emulgierten spezifischen Lipasefarbsubstrats, dem 1,2-O-Dilauryl-rac-glycero-3-glutarsäure-(6-methylresorufin)-ester. Mit der eingesetzten Kombination aus Gallensäuren und Colipase wird das Pankreasenzym spezifisch erfasst. Bei Abwesenheit von Colipase wird praktisch keine Lipaseaktivität nachgewiesen. Die Colipase aktiviert nur die Pankreaslipase, nicht andere im Serum vorkommende lipolytische Enzyme. Durch den hohen Anteil an Cholaten ist sichergestellt, dass im Serum vorkommende Esterasen aufgrund der hohen negativen Grenzflächenladung nicht mit dem Farbsubstrat reagieren können. Das Lipasefarbsubstrat wird unter katalytischer Einwirkung von Lipase in alkalischer Lösung zu 1,2-O-Dilauryl-rac-glycerin und einem instabilen Zwischenprodukt, dem Glutarsäure-(6-methylresorufin)-ester, gespalten. Dieser zerfällt in alkalischer Lösung spontan in Glutarsäure und Methylresorufin. Die Farbintensität des gebildeten roten Farbstoffs, direkt proportional der Lipaseaktivität, wird photometrisch gemessen. Die Messung erfolgte mittels des EPOS 5060 Analyser, Eppendorf, Hamburg,

Deutschland. Diese Untersuchungen erfolgten im Routinelabor der klinischen Chemie der Universität Rostock.

2.3.6 Immunhistochemie (IHC)-Färbung

2.3.6.1 Prinzip

Bei dem Prinzip der verwendeten Färbemethode handelt es sich um die Alkalische Phosphatase-anti-Alkalische Phosphatase-(AAPAP)-Methode (schematische Darstellung in **Abb. 8**). Der gegen das Antigen der Ratte gerichtete monoklonale Primärantikörper stammen von der Maus und binden an das jeweilige spezifische Leukozyten-Antigen: T-Lymphozyten (R73), $CD4^+$ (Ox38), $CD8^+$ (Ox8), B-Lymphozyten (Ox33), Granulozyten (RK4), Monozyten (HIS36) und $CD25^+$, IL-2R (Ox39). Der Sekundärantikörper (anti-Maus-Antikörper vom Kaninchen) wirkt hier als Brückenantikörper und bindet mit der einen Antigen-Bindungsstelle an den Primärantikörper und mit der anderen Bindungsstelle den AAPAP-Komplex. Dieser AAPAP-Komplex ist ein monoklonaler Maus-Antikörper, an den sein Antigen, die alkalische Phosphatase (aP) vom Kalb gebunden ist. Die Visualisierung der aP-Bindung erfolgte mit der enzymatischen Umwandlung von Naphtol-Bisphosphat als Substrat in einen unlöslichen Farbstoff (**Abb. 8**). Die Zellkerne wurden mit Hämatoxylin gegengefärbt. Die Zählung der markierten Zellen erfolgte jeweils durch 2 Untersucher ohne Kenntnis der Gewebezuordnung.

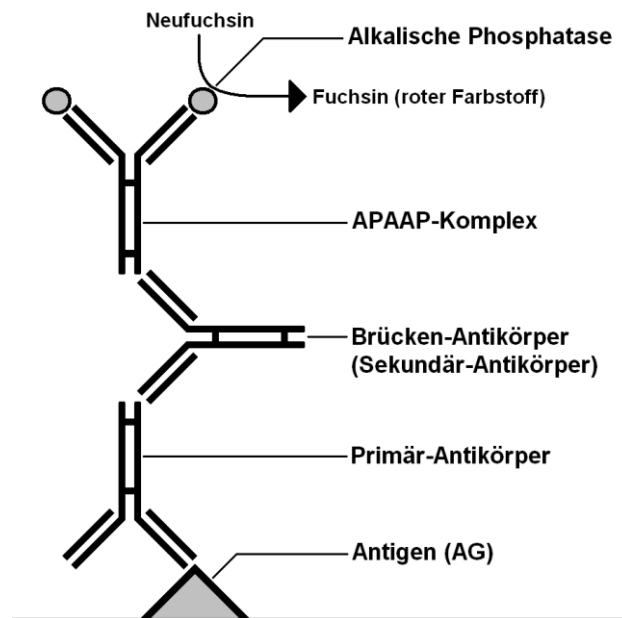


Abb. 8: Prinzip der APAAP-Färbung

2.3.6.2 Chemikalien

- Tissue-Tek®, O.C.T.™ Compound, Sakura, Staufen, Deutschland.
- Tris-gepufferte Kochsalzlösung (TBS-Puffer) zum Waschen der Schnitte zwischen den einzelnen Inkubationssphasen. Herstellung: 1 Teil 0.05 M Tris-Puffer ($\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$, Hersteller: Zentralapotheke Universität Rostock, Rostock, Deutschland) und 9 Teile 0,9 % NaCl. Mit 1Molarer HCl erfolgte die Titration des Puffers auf einen pH-Wert von 7,5. Das sich ergebende Volumen wurde in Zentrifugenröhrchen abgefüllt und bei -20°C eingefroren.
- Als Verdünnungs-Medium wurde die Waschpuffer-Lösung verwendet. Dazu wurde diese mit als Verdünnungsmedium, um die Antikörper-Lösungen entsprechend den für den jeweiligen Antikörper optimalen Konzentrationen zu verdünnen.
- monoklonale Primär-Antikörper zur spezifischen Markierung der Antigene. Diese Maus-anti-Ratte-Antikörper wurden folgendermaßen hergestellt:
 - **RK4-Antikörper** gegen Ratten-Granulozyten, BMA Biomedicals, Augst, Schweiz, verwendet in einer Verdünnung von 1:500.
 - **R73-Antikörper** gerichtet gegen $\alpha\beta$ -T-Zell-Rezeptor (TCR) von Pharmingen, San Diego, USA, in einer Konzentration von 1:500.
 - **Ox38-Antikörper** bindet an Ratten-CD4-Antigen. Verwendet in einer Konzentration von 1:500. Pharmingen, San Diego, USA.
 - **Ox8-Antikörper** gegen Ratten-CD8-Antigen. Verdünnung 1:500, Pharmingen., USA.
 - **Ox39-Antikörper** gerichtet gegen die α -Kette des IL-2-Rezeptors (CD 25) aktivierter T-Zellen. 1:500-Verdünnung. Pharmingen, San Diego, USA.
 - **Ox33-Antikörper** reagiert mit CD45RA auf B-Lymphozyten von Ratten. Bei der Immunhistochemie-Färbung Konzentration von 1:50. Pharmingen, San Diego, USA.
 - **Ox26-Antikörper** ist gerichtet gegen den Transferrin-Rezeptor. Dieser Rezeptor wird vermehrt von sich teilenden Zellen exprimiert. Verdünnung 1:200. Serotec Ltd., Kidlington, Großbritannien.
 - **HIS36-Antikörper** reagiert mit Gewebe-Makrophagen. Verdünnung 1:1000. Pharmingen, San Diego, USA.
- sekundärer Antikörper Kaninchen-anti-Maus zur Markierung der Primär-Antikörper. Dieser als Brücken-Antikörper funktionierende Antikörper stellt die Verbindung zwischen dem Primär-Antikörper und dem APAAP-Komplex her und wurde in einer Verdünnung von 1:50 verwendet. Hierzu wurden 20 μl sekundärer Antikörper gemischt mit 1000 μl TBS und 200 μl Rattenserum.
- Der monoklonale APAAP-Komplex zur Markierung der Sekundär-Antikörper ist ein

Maus-anti-Alkalische Phosphatase-Antikörper der in seiner Antigen-Bindungsstelle das Enzym alkalische Phosphatase vom Kalb gebunden hat. Benutzt wurde dieser Antikörper in einer Verdünnung von 1:50, indem 20 µl APAAP-Komplex gemischt wurden mit 1000 µl TBS-Puffer.

- DAKO Neufuchsin Substratsystem wurde zu Färbung benutzt. Es enthält alle für die Färbung nötigen Substanzen (DAKO, Via Real, California, USA).
- Levamisol, Inhibitor der endogenen alkalischen Phosphatase (DAKO, Via Real, USA).
- 20%-ige Hämatoxylin-Lösung zur Gegenfärbung der Schnitte. Herstellung: Zu 80 ml destilliertem Wasser wurden 20 ml Hämatoxylin (DAKO, Via Real, CA, USA) gegeben.

2.3.6.3 Färbung der Gewebeschnitte

Von dem nach Zugabe von Tissue-Tek® in flüssigem Stickstoff tiefgefrorenen Pankreasgewebe wurden 5 µm starke Kryostat-Schnitte angefertigt und diese auf Objektträger verbracht. Die Objektträger wurden bis zur Weiterverarbeitung in Aluminiumfolie eingewickelt und im Tiefkühlfach bei -20°C aufbewahrt. Das Auftauen erfolgte noch eingewickelt in die Aluminium-Folie, um Feuchtigkeit von den Objektträgern vor der Fixation abzuhalten. Fixiert werden die Schnitte 5 Minuten mit Aceton. Danach erfolgte die Inkubation für 30 Minuten mit 50 µl des entsprechenden Primärantikörpers (AK = Maus-anti-Ratte) Konzentrationen siehe 2.3.6.2). Die Verdünnung der Primärantikörper wurde mit TBS-Puffer vorgenommen, auf die Negativ-Kontrollen wurde nur Puffer ohne Primär-AK aufgebracht. Die AK-Lösung wurde dann mit Aqua dest. abgespült und mit Tris-Puffer gewaschen, anschließend 50 µl Sekundär-Antikörper (AK = Kaninchen-anti-Maus, Brücken-Antikörper, monoklonal) in der Verdünnung 1:50 zugegeben und ebenfalls 30 Minuten inkubiert. Nach Verstreichen der Inkubationszeit erfolgte das Abwaschen der Antikörper-Lösung wie nach der Inkubation mit den Primärantikörpern. Zur Visualisierung der AK-Bindung wurden die Präparate mit dem Alkalische Phosphatase-anti-Alkalische Phosphatase (APAAP-Komplex) versetzt, der als Maus-IgG vom Brückenantikörper gebunden wird. Das F(ab)-Fragment des Immunglobulins enthält das Enzym Alkalische Phosphatase (AP) vom Kalb. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten wurden die Präparate mit PBS gewaschen. Als Substrat für die Färbereaktion wurde das DAKO®-Fuchsin-Substrat-Chromogen-System verwendet, dem noch 3 Tropfen Levamisol-Lösung hinzugegeben wurden, um die endogene AP zu inhibieren. Die AP katalysiert die Dephosphorylierung von Naphthol-Bisphosphat zu Phenolkomponenten, die mit Fuchsin einen unlöslichen roten Azofarbstoff bilden. Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten

wurde die Färbelösung abgewaschen und die Objektträger zur Kernfärbung in Mayer's Hämatoxylin für 1 Minute inkubiert. Die Präparate wurden in Einbettmedium (Aquatex, Merck) mit Deckgläschen fixiert.

2.3.6.4 Auszählung der gefärbten Gewebsschnitte

Die gefärbten Gewebsschnitte wurden von 2 Untersuchern ohne Kenntnis der Gewebszuordnung ausgezählt. Bei einer 400x-Vergrößerung wurde eine im Okular eingravierte Zählmaske ($0,625 \text{ mm}^2$) zur Auszählung verwandt. Die Ergebnisse wurden angegeben in Zellen/ mm^2 .

2.3.7 Fluoreszenz-aktivierte Zell-Sortierung (FACS-Analyse)

2.3.7.1 Prinzip

Der FACS-Scanner detektiert fluoreszierende Partikel und erlaubt so die Analyse von Zellen, die mit einem gegen Zell-Antigene gerichteten fluoreszierenden Antikörper markiert sind. Zunächst wurden Leukozyten mit entsprechenden spezifischen monoklonalen Primär-Antikörpern (z.B. anti-CD4⁺) inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe des gegen diese Antikörper gerichteten Sekundär-Antikörper, an den FITC-(Fluorescein Isothiocyanat, grüne Fluoreszenz, Anregung bei 488 nm) gebunden ist (**Abb. 9**). Der bei der FACS-Analyse verwendete Puffer erzeugt einen Hüllstrom, so dass der Laserstrahl nur Einzelzellen erfasst (hydrodynamische Fokussierung). Alle Zellen werden im Vorwärtsstreulicht (forward-scatter = FSC) und im Seitwärtsstreulicht (sideward-scatter = SSC) (**Abb. 10**) registriert und in einem Dot-Plot-Diagramm dargestellt. Basierend auf Größe und Granularität können hier bereits unterschiedliche Zellpopulationen identifiziert werden. Unter Verwendung des entsprechenden Fluoreszenzfilters kann dann der Anteil der Zellen mit dem gebundenen AK nachgewiesen werden.

FACS-Untersuchungen wurden mit jeweils einem spezifischen Primär-Antikörper in jeder Probe durchgeführt. Deshalb war auch nur eine Art Sekundär-Antikörper nötig, um die jeweils gesuchte Zellart zu identifizieren. Die erfassten Ereignisse (counts) wurden gegen die Fluoreszenzintensität (FL1) in einem Histogramm aufgetragen (siehe **Abb. 11**).

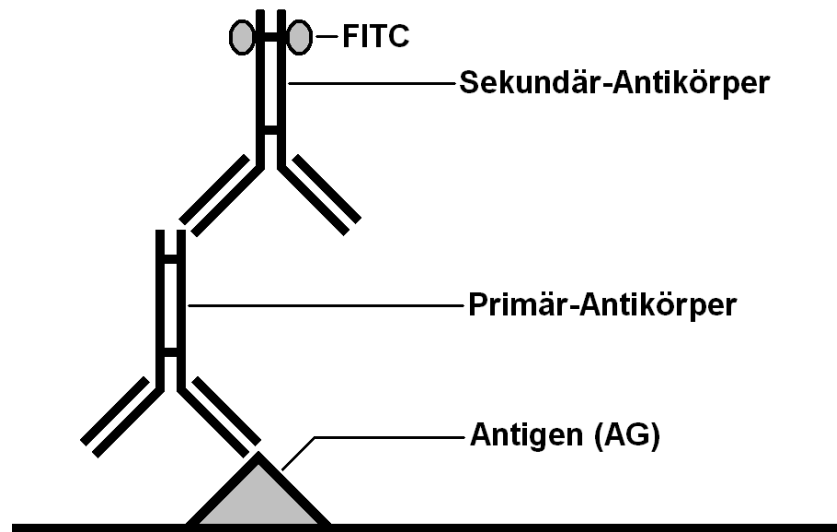


Abb. 9: Prinzip der Antikörper-Markierung (FACS)

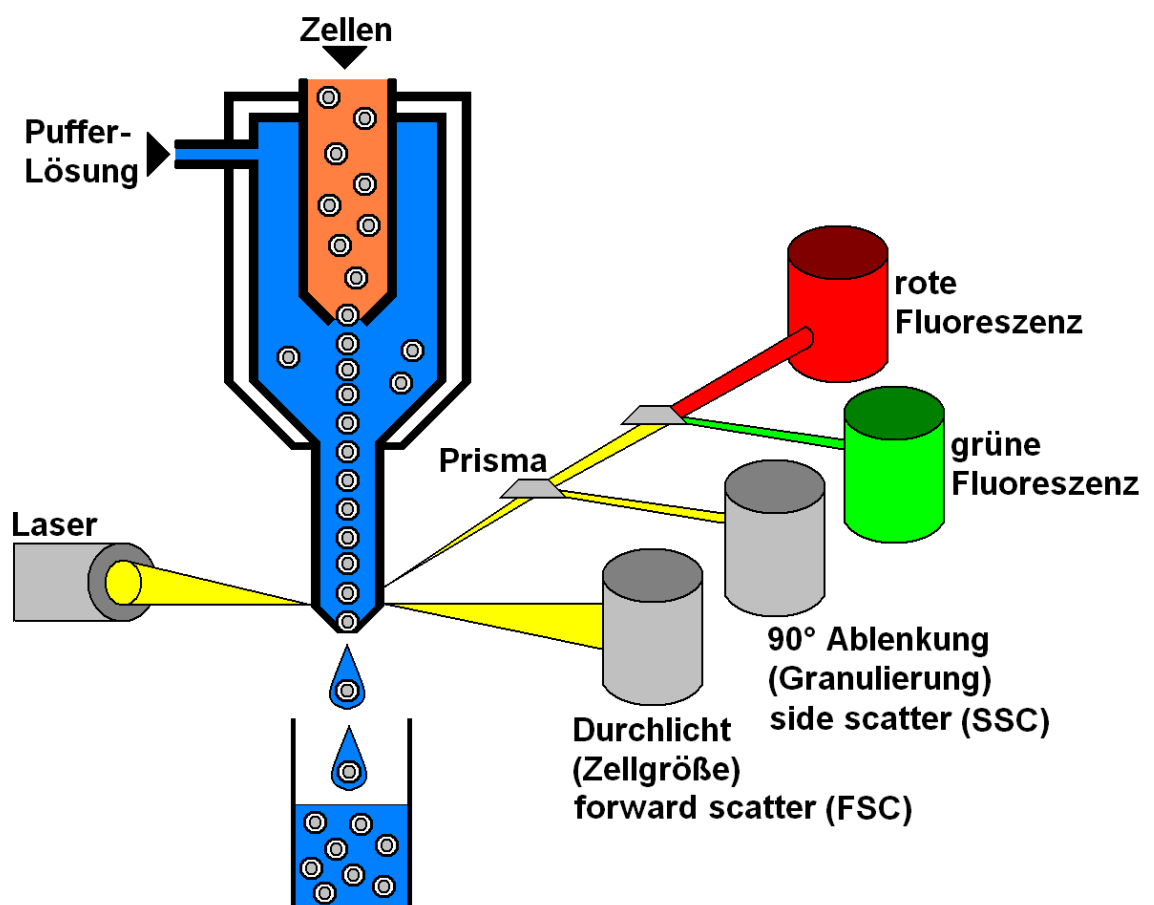


Abb. 10: Prinzip der FACS-Messung

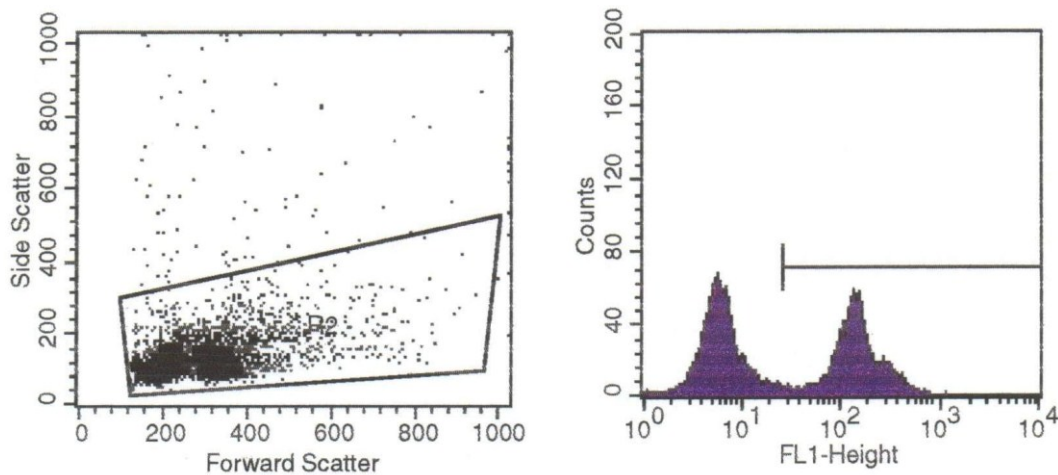


Abb. 11: Darstellung eines typischen Dot-Plot-Diagramms (links) und eines Histogramm (rechts). Im links dargestellten Dot-Plot-Diagramm erkennt man die vorher Fluorescein Isothiocyanat-(FITC)-Antikörper-markierte Zell-Population entsprechend ihrer Größe im forward scatter (FSC) und Granularität im side scatter (SSC). Die zu zählenden Ereignisse wurden mittels eines gates eingegrenzt. Im Histogramm erfolgte die logarithmische Darstellung und Trennung der nachzuweisenden Zellen anhand eines Intensitätsschwellenwertes der Fluoreszenz.

2.3.7.2 Identifizierung der mononukleären Zellen

Die gewaschenen Lymphozyten aus Blut, Milz und Lymphknoten wurden in einer Konzentration von $1-2 \times 10^6/\text{ml}$ in PBS-Puffer + 1% FKS in FACS-Röhrchen aufgenommen. Anschließend wurden diese Zellen bei 2000 rpm / 4°C / 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand dekantiert. 50 μl Primärantikörper gegen folgende Leukozyten-Antigene R73 (CD3/TCR), Ox38 (CD4), Ox8 (CD8), Ox39 (CD 25/IL-2-Rezeptor) und Ox33 (CD45RA) wurden dann in festgelegten Verdünnungen von 1:100 hinzugegeben, gevortext und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Nach 2-maligem Waschen mit PBS-Puffer + 1% FKS bei 2000 rpm / 4°C / 5 min wurde dann mit dem FITC-markierten Sekundärantikörper, verdünnt auf 1:100 mit FACS-Puffer + 10% Rattenserum, für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einmaligem Waschen mit PBS-Puffer + 1% FKS bei 2000 rpm / 4°C / 5 Minuten wurde die Zell-Lösung mit auf 1% verdünnter Cellfix®-Paraformaldehyd-Lösung für 10 Minuten fixiert. Anschließend wurde wiederum mit PBS-Puffer + 1% FKS bei 2000 rpm / 4°C / 5 Minuten gewaschen, das Pellet in PBS-Puffer aufgenommen und bis zur FACS-Messung bei 4°C gelagert.

2.3.7.3 Messung und Auswertung

Die Messung der markierten Zellsuspensionen erfolgte mit einem FACSCalibur® Durchflusszytometer (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland), das mit einem Argon-

Laser (488 nm) ausgestattet ist. Die Auswertung wurde mit den Programmen CellQuest® (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) und WinMDI 2.8 (Freeware, Joseph Trotter) vorgenommen. Die Aufarbeitung der Daten und Darstellung der Ergebnisse erfolgte mit der Software Excel 2000 (Microsoft, München, Deutschland). Es wurden in der Regel 10.000 Zellen bzw. Ereignisse pro Färbung analysiert

2.3.7.4 Chemikalien

- FACS-Puffer = PBS-Puffer + 1% FKS.
- monoklonale Primär-Antikörper zur spezifischen Markierung der Antigene. Diese Maus-anti-Ratte-Antikörper wurden folgendermaßen hergestellt:
 - **RK4-Antikörper** gegen Ratten-Granulozyten (BMA Biomedicals AG, Augst, Schweiz) verwendet in einer Verdünnung von 1:100.
 - **R73-Antikörper** gerichtet gegen $\alpha\beta$ -T-Zell-Rezeptor (TCR) (Pharmingen, San Diego, USA) in einer Konzentration von 1:100.
 - **Ox38-Antikörper** bindet an Ratten-CD4-Antigen. Benutzt in einer Konzentration von 1:100 (Pharmingen, San Diego, USA).
 - **Ox8-Antikörper** gegen Ratten-CD8-Antigen. Verdünnung 1:100. (Pharmingen, San Diego, USA).
 - **Ox39-Antikörper** gerichtet gegen die α -Kette des IL-2-Rezeptors (CD 25) aktivierter T-Zellen. 1:100-Verdünnung. (Pharmingen, San Diego, USA).
 - **Ox33-Antikörper** reagiert mit CD45RA auf B-Lymphozyten von Ratten. Bei der Immunhistochemie-Färbung wurde eine Konzentration von 1:100 verwendet. (Pharmingen, San Diego, USA).
 - **Ox26-Antikörper** ist gerichtet gegen den Transferrin-Rezeptor. Dieser Rezeptor wird vermehrt von sich teilenden Zellen exprimiert. Verdünnung 1:1000 (Serotec Ltd., Kidlington, Großbritannien).
 - **HIS36-Antikörper** reagiert mit Gewebe-Makrophagen. Verdünnung 1:100 (Pharmingen, San Diego, USA).
- Der Sekundär-Antikörper ist ein FITC-(Fluorescein Isothiocyanat)-markierter Schaf-anti-Maus-IgG-Antikörper (Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri, USA). Er wurde verwendet in einer Verdünnung von 1:100. Hierzu wurden 12 μ l Sekundär-Antikörper vermischt mit 120 μ l Rattenserum und 1070 μ l PBS-Puffer.
- Rattenserum (Biochrom, Berlin, Deutschland).
- Fetales Kälberserum (FKS) (Biochrom, Berlin, Deutschland).

- Paraformaldehyd wurde zur Fixierung der FACS-Ansätze verwendet. 400 µl Cellfix® 10%-Lösung (Becton Dickinson, Mountain View, CA USA) wurde verdünnt mit 3600 µl PBS-Puffer um eine 1%-ige Lösung herzustellen.
- FACSFlow (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA).

2.3.8 Extraktion der RNA

Die Gewinnung der RNA wurde nach der Guanidinthiocyanat/Phenol-Methode durchgeführt und folgte im Wesentlichen dem von Sparmann vorgeschlagenen Protokoll ⁽⁸²⁾ zur RNA-Extraktion aus humanem und Ratten-Pankreas-Gewebe. Hierbei wurden 30-70 mg des tiefgefrorenen Pankreas-Gewebes im von außen mit flüssigem Stickstoff gekühlten Mörser zermahlen. Dem Gewebepulver wurden 500 µl GTC-Lösung zugegeben und das Gemisch in ein Zentrifugenröhrchen auf Eis überführt. Es folgte die Zugabe von 3,5 ml GTC, 400 µl Natrium-Acetat (2M, pH 4,0), 4 ml AquaPhenol® und 800 µl ReadyRed®. Nach jedem Schritt wurde für 5 Sekunden, nach der letzten Zugabe 15 Sekunden gevortext. Danach erfolgte eine Inkubation für 15 Minuten auf Eis.

Im Anschluss wurde für 30 Minuten bei 10.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Aus der sich ergebenden zweischichtigen Lösung wurde die wässrige obere RNA-haltige Phase (ca. 3 ml) mittels einer Pipette abgehoben und in ein vorgekühltes 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt, anschließend mit dem gleichen Volumen tiefgekühlten Isopropanol versetzt und 24h bei -20°C inkubiert, um die RNA zu fällen.

Nach dieser Inkubationszeit wurde wiederum für 30 Minuten bei 10.0000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und 2-mal mit Ethanol (75 %) gewaschen (zunächst mit 3 ml, dann mit 1 ml). Das RNA-Pellet wurde nach Luft-Trocknung in einem Volumen von 50-100 µl DEPC-Wasser gelöst.

Die Konzentration der RNA wurde anschließend spektrophotometrisch bestimmt sowie die Integrität der RNA in der Gel-Elektrophorese überprüft. Die Absorptions-Messung wurde an einem Ultrospec 3000 UV/Visible Spectrophotometer (Pharmacia Biotech (Biochrom) Ltd., Cambridge, England) durchgeführt. Bestimmt wurde die Konzentration der gemessenen Probe bei einer Wellenlänge von 260 nm und die Reinheit als Absorptionsverhältnis bei 260 und 280 nm Wellenlänge. Die Exstinktion von 1 entspricht einer Konzentration von 40 µg/ml RNA. Daraus konnte unter Berücksichtigung der Verdünnung die Konzentration der Probe berechnet werden.

Für die Elektrophorese der RNA-Extraktions-Produkte wurde ein 1%-iges Agarose-Gel verwendet. Sie wurde bei 60-80 V (je nach Gel-Größe) für 1,5 h in 1x TAE-Puffer durchgeführt; für die Gel-Färbung wurde Ethidiumbromid (1 mg/l) verwendet. Pro Well

wurden 3 µg RNA pipettiert. Dokumentiert wurden die Gele bei UV-Fluoreszenz mit Hilfe eines computergestützten Video-Dokumentationssystems (Herolab, Wiesloch, Deutschland) (**Abb. 12**). Nach Feststellung der RNA-Integrität und Ausschluss von Kontamination mit genomischer DNA wurden die RNA-Proben bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

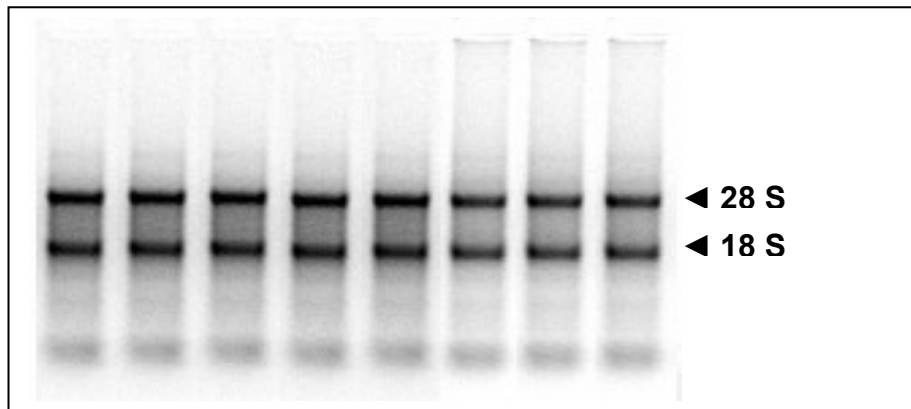


Abb. 12: Gel-Elektrophorese von 3 µg RNA pro Probe in einem 1%igen Ethidiumbromid-haltigen Agarose-Gel. Die Banden stellen die undegradierte 18S- und 28S-ribosomale RNA dar. Mittels dieser Auftrennung erfolgt die Prüfung der Integrität der extrahierten RNA.

2.3.8.1 Chemikalien

- GTC = Guanidin-Thiocyanat (Fluka, Berlin, Deutschland) hergestellt als 4 M Lösung. Die entsprechende Menge GTC (236,32 g auf 500 ml) wurde in 1/10 des Endvolumens 1 M TRIS-Puffer gelöst, mit destilliertem Wasser aufgefüllt und mit Salzsäure (HCl) eingestellt auf einen pH-Wert 7,2. Anschließend wurde durch ein 0,2 µm - Sieb filtriert. Unmittelbar vor Gebrauch wurde 2-Mercaptoethanol in einer Endkonzentration von 0,1% zugesetzt.
- 2-Mercaptoethanol (Sigma Chemical, Deisenhofen, Deutschland).
- Natrium-Acetat (CH₃COO-Na) (Fluka, Berlin, Deutschland) als 2 M Lösung hergestellt und für die RNA-Extraktion auf den pH-Wert 4,0 eingestellt.
- AquaPhenol® (Appligene, Illkirch, Frankreich).
- ReadyRed® = Chloroform (CHCl₃) (Appligene, Illkirch, Frankreich).
- Isopropanol (DAKO, Via Real, California, USA).
- Ethanol 75% = 150 ml Ethanol reinst (96%) + 50 ml DEPC-H₂O (Zentralapotheke Universität Rostock, Rostock, Deutschland).
- Diethyl-Pyrocyanat (DEPC) (Sigma Chemical, Deisenhofen, Deutschland).
- Seakem® LE agarose (FMC BioProducts, Rockland, Maine, USA).
- Ethidiumbromid (Sigma Chemical, Deisenhofen, Deutschland).

2.3.9 Reverse Transkription und kompetitive Polymerasekettenreaktion (RNA-(RT)-PCR)

2.3.9.1 Prinzip

Die RNA-(RT)-PCR ist eine hochsensible Methode, mit der man ganz allgemein die Genexpression auf der Stufe der RNA untersuchen, aber auch speziell die Menge von mRNA und viraler RNA bestimmen kann.

Hierzu benutzt man zunächst eine Reverse Transkriptase für die Synthese des komplementären cDNA-Stranges. Das hier verwendete Enzym stammt vom Moloney-Maus-Leukämie-Virus (MMLV). Als RNA-abhängige DNA-Polymerase benötigt das Enzym eine einzelsträngige Ribonukleinsäure (RNA) als Matrize. In Gegenwart eines Primers synthetisiert die Reverse Transkriptase (RT) in 5'-3'-Richtung eine komplementäre DNA (cDNA). Als Primer-Bindungsstelle benutzt man den polyadenylierten Bereich am 3'-Ende der mRNA, der aus etwa 200 Adenosin-5'-monophosphat-(AMP)-Resten aufgebaut ist. Aus diesem Grund benutzt man einen Oligo-dT-Primer, der in dieser mRNA-Region bindet, damit die RT den cDNA-Strang synthetisieren kann. Die so gewonnene cDNA dient als Vorlage zur nachfolgenden Amplifizierung mittels der Polymerasekettenreaktion (PCR). Das Prinzip der PCR basiert auf der hitzestabilen Taq-DNA-Polymerase, die aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* isoliert wird. Bei einem Temperaturoptimum von 72°C synthetisiert das Enzym die komplementäre DNA eines einzelsträngigen Templates. Da kurze DNA (bzw. RNA) – Sequenzen eine hohe Spezifität aufweisen, ist die Amplifikation kleinerer cDNA-Abschnitte ausreichend. Die DNA-Synthese beginnt am 3'-Ende eines Oligonukleotids. Diese Primer sind jeweils komplementär zu einem der beiden DNA-Doppelstränge im Abstand von einigen 100 Basenpaaren. Das Temperaturprofil der PCR ist so eingerichtet, dass die DNA zunächst denaturiert wird, anschließend lagern sich die Primer an und die Synthese des jeweiligen Stranges aus Nukleotidtriphosphaten erfolgt. Dieser Zyklus wird mehrfach wiederholt, wodurch die Zahl der Amplifikate exponentiell ansteigt. Somit kommt es nach mehreren Amplifikationszyklen zu einem exponentiellen Anwachsen der entsprechenden DNA-Moleküle. Die folgenden schematischen Darstellungen (**Abb. 13 + 14**) erläutern die RT-Reaktion und die PCR:

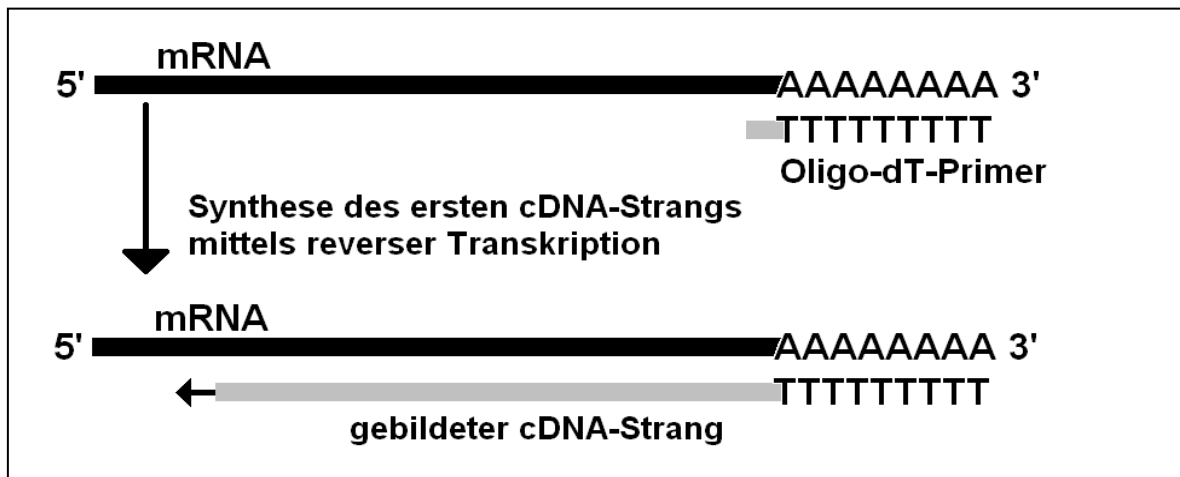


Abb. 13: Prinzip der Reverse-Transkriptase-(RT)-Reaktion, Synthese des cDNA-Stranges mittels Reverser Transkriptase (RT)

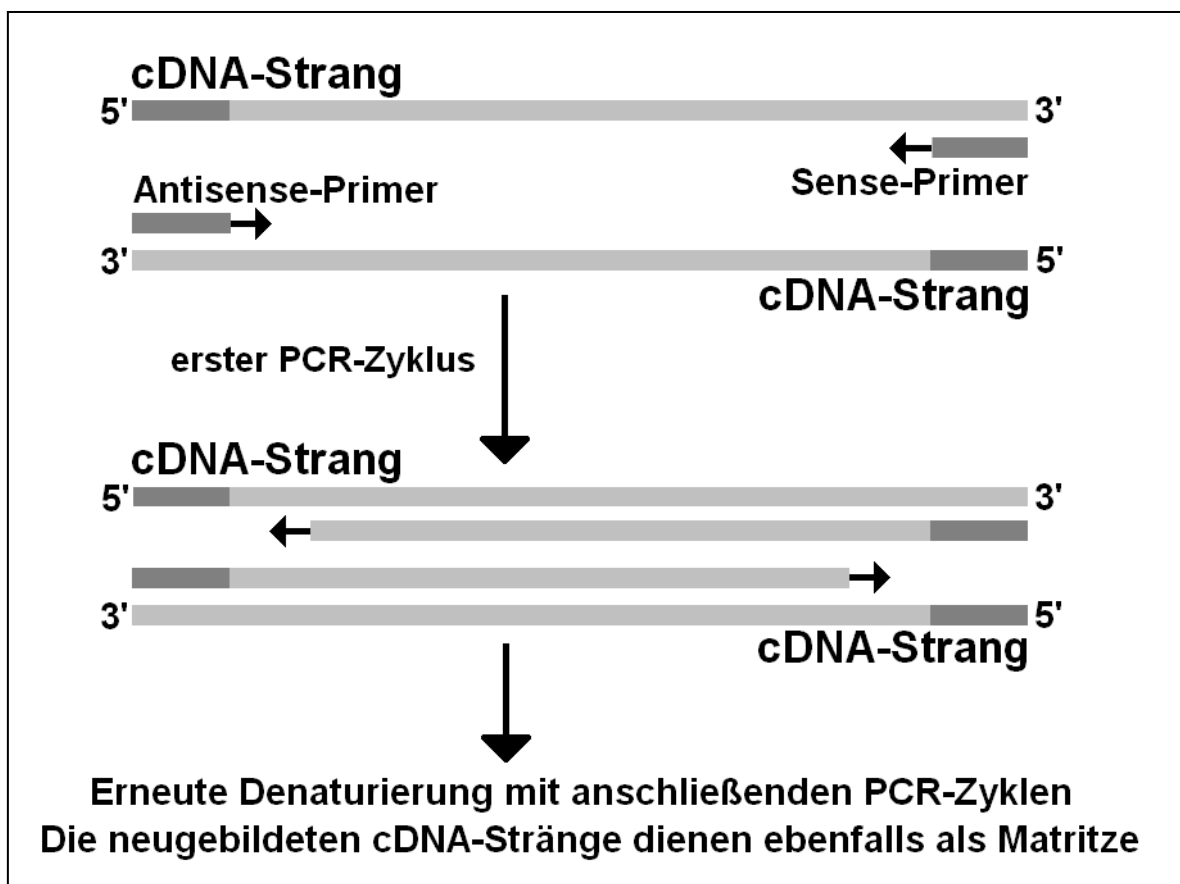


Abb. 14: Prinzip der Polymerasekettenreaktion (PCR). Amplifizierung der cDNA-Stränge mittels Taq-DNA-Polymerase. Neu gebildete DNA-Stränge dienen wiederum als Vorlage für den nächsten PCR-Zyklus, weshalb es zu einem exponentiellen Anwachsen der Anzahl der entsprechenden DNA-Fragmente kommt.

2.3.9.2 Chemikalien

- dNTP = Deoxyribonukleosid-Triphosphate ATP, CTP, GTP, TTP. Konzentration der einzelnen dNTPs jeweils 250 µM. (FMC BioProducts, Rockland, Maine, USA).
- Dithiothreitol = DTT, Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland.
- Moloney-Mäuse-Leukämie-Virus-(MMLV)-Reverse Transkriptase, Life Technologies.
- Oligo-(dT)₁₂₋₁₈-Primer, GibcoBRL®, Life Technologies, Eggenstein, Deutschland.
- first strand puffer, GibcoBRL®, Life Technologies, Eggenstein, Deutschland.
- Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitor, Promega, Madison, WI, USA.
- DEPC-Wasser, GibcoBRL®, Life Technologies, Eggenstein, Deutschland.
- Ampli Taq® ist die DNA-Polymerase des thermophilen Bakteriums *Thermus aquaticus* (Perkin Elmer / Cetus, Emeryvill, California, USA).
- Kontrollfragment (KF) in absteigenden Zehner-Potenzen verdünnt. Von 1 pg (10^{-12}) – 0,01 fg (10^{-15}), Life Technologies, Eggenstein, Deutschland.
- Primer-Sequenzen (Sense / Antisense)
 - **β-actin-Primer** 5'-CTATCGGCAA TGAGCGGTTC-3' (sense)
 5'-CTTAGGAGTT GGGGGTGGCT-3' (antisense)
 - **IL-2-Primer** 5'-GCGCACCCAC TTCAAGCCCT-3' (sense)
 5'-CCACCACAGT TGCTGGCTCA-3' (antisense)
 - **IL-2-Rezeptor Primer** 5'-CGCGAATTCCG CCACCATGG-3' (sense)
 5'-CGCGGATCCCG CCACCGAG-3' (antisense)
 - **IL-4-Primer** 5'-ATGCACCGAG ATGTTTGTACC-3' (sense)
 5'-TTTCAGTGTT CTGAGCGTGGA-3' (antisense)
 - **IL-5-Primer** 5'-TGACGAGCAA TGAGACGATG-3' (sense)
 5'-TCATCACGCC AAGGAACTCT-3' (antisense)
 - **IL-6-Primer** 5'-CTTCCAGCCA GTTGCCTTCT-3' (sense)
 5'-GAGAGCATTG GAAGTTGGGG-3' (antisense)
 - **IL-10-Primer** 5'-TGCCTTCAGT CAAGTGAAGACT-3' (sense)
 5'-AAACTCATTC ATGGCCTTGTA-3' (antisense)
 - **IFN-γ-Primer** 5'-CCCTCTCTGG CTGTTACTGC-3' (sense)
 5'-CTCCTTTTCC GCTTCCTTAG-3' (antisense)
- Mg²⁺-Lösung (FMC BioProducts, Rockland, Maine, USA).
- Agarose-Gel Seakem® LE Agarose, FMC BioProducts, Rockland, Maine, USA.
- TAE-Puffer wurde in einer 50-fachen Konzentration hergestellt und vor Gebrauch verdünnt (Endkonzentration: 40 mM Tris-Acetat, 2 mM EDTA)
- DNA-Ladder 100 bp, New England Biolabs (NEB), Frankfurt am Main, Deutschland.

2.3.9.3 Reverse Transkription (RT)

Die Synthese der cDNA erfolgte nach Murphy et al.⁽⁸³⁾ unter Verwendung der reversen Transkriptase des Moloney Mäuse-Leukämie-Virus (MMLV) und von Oligo-DT₋₁₂₋₁₈-Primern. Zur Herstellung eines Reaktionsvolumens von 40 µl wurden folgende Reagenzien in die reverse Transkription eingebracht:

<u>Probenansatz:</u>	RNA (3 µg mit H ₂ O verdünnt)	21,0 µl
	Oligo(dT)-Primer (0,5 µg/µl)	1,0 µl
	First Strand Puffer	8,0 µl
	DTT (Dithiothreitol)	4,0 µl
	dNTP-Mix	4,0 µl
	RNAsin	1,0 µl
	<u>MMLV (Enzym)</u>	<u>1,0 µl</u>
	<u>Reaktionsvolumen</u>	<u>40,0 µl</u>

21 µl RNA wurde mit 1 µl Oligo(dT)-Primer in ein 200 µl Eppendorf-Röhrchen pipettiert und bei 65°C für 10 Minuten im Thermocycler denaturiert. Anschließend erfolgte die Abkühlung auf 4°C für 3 Minuten. Nun wurde den Proben-Röhrchen auf Eis gekühlt der Reaktions-Mix aus 8,0 µl First Strand Buffer, 4,0 µl DTT, 4,0 µl dNTP-Mix, 1,0 µl MMLV und 1,0 µl RNAsin zugegeben. Nach diesen 3 Minuten wurden die Proben zurück in den Thermocycler gegeben, wo 60 Minuten bei 37°C die Synthese der cDNA erfolgte. Anschließend wurde für 4 Minuten bei 95°C denaturiert, gefolgt von einer konstanten Abkühlung auf 4°C zur Lagerung. Die cDNA wurde danach im -80°C-Gefrierschrank gelagert.

<u>RT-Programm:</u>	70°C (Denaturierung)	10 min
	4°C (Zugabe des Mix)	3 min
	37°C (cDNA-Synthese)	60 min
	95°C (Denaturierung)	4 min
	4°C (Lagerung)	konstant

2.3.9.4 Kompetitive Polymerasekettenreaktion (PCR) mit Kontroll-Fragment (KF)

Um eine Quantifizierung der Expression vornehmen zu können, verwendeten wir die kompetitive PCR. Dabei wurde ein synthetisches DNA-Fragment von 613 bp als interner Standard (Kontrollfragment, KF) verwendet⁽¹³⁵⁾. Dieses KF enthielt dieselben

Primersequenzen wie die zu untersuchenden cDNA-Proben [Zytokine, Lymphozyten-Oberflächen-Marker und Housekeeping-Proteine wie β -Actin und Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase (HPRT)]. KF und cDNA wurden in einem Ansatz unter identischen Bedingungen amplifiziert. Da die PCR-Produkte vom KF und der jeweiligen cDNA unterschiedlich lang sind, konnten sie mittels Elektrophorese getrennt werden. Die Fluoreszenz-Intensität der PCR-Fragmente in dem Ethidiumbromid-haltigen Agarosegel ist proportional zu der DNA-Menge. So konnte auf Grundlage der definierten KF-Konzentration auf die relative cDNA-Menge geschlossen werden, wodurch ein Vergleich der mRNA-Expression unter verschiedenen Bedingungen möglich wurde.

Die Einstellung der verschiedenen Proben auf gleiche Ausgangskonzentrationen erfolgte mit dem Housekeeping-Gen β -Actin (**Abb. 15**).

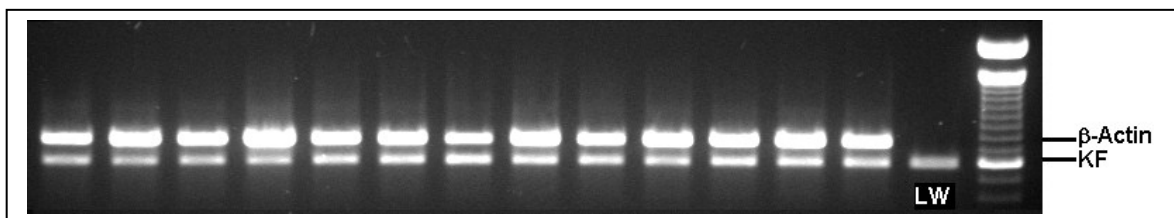


Abb. 15: β -Actin-PCR zur Einstellung der einheitlichen Konzentration

Die PCR-Reaktionen wurden in einem Ansatz von 25 μ l pro Probe durchgeführt. Dazu wurden 15,9 μ l PCR- H_2O , 2,5 μ l 10x PCR-Puffer, 0,5 μ l $MgCl_2$ (50 mM), 2,0 μ l dNTP's (je 250 μ M dATP, dTTP, dGTP, dCTP), je 1,0 μ l Oligonukleotid-Primer Sense (S) und Antisense (AS) (10 μ M) und 0,1 μ l Taq-DNA-Polymerase (5 Units/ μ l) als Master-Mix vorgelegt. Dann wurde pro Probe je 1,0 μ l cDNA dazu pipettiert und entsprechend der errechneten Annealing-Temperatur der Primer in einem Peltier-Thermo-Cycler inkubiert.

<u>Probenansatz:</u>	cDNA (1:5 verdünnt mit H_2O)	1,0 μ l
	10x PCR-Puffer	2,5 μ l
	dNTP (dATP, dTTP, dGTP, dCTP / je 250 μ M)	2,0 μ l
	Forward Primer (S) (25 μ M)	1,0 μ l
	Reverse Primer (AS) (25 μ M)	1,0 μ l
	Kontrollfragment (KF) (versch. Konz.)	1,0 μ l
	Mg^{2+}	0,5 μ l
	Taq-DNA-Polymerase (0,5 U)	0,1 μ l
	H_2O	15,9 μ l
	<u>Reaktionsvolumen</u>	<u>25,0 μl</u>

Die Reaktionsansätze mit den jeweils spezifischen Primern für die nachzuweisenden cDNA-Sequenzen wurden bei verschiedenen Programmen im Cycler exponentiell vervielfältigt. Diese Programme setzen sich zusammen aus DNA-Denaturierung, Primer-Bindung (Annealing) und Synthese (Elongation).

Die jeweilige Annealing-Temperatur (T_m) für jeden Primer errechnet sich aus ihrer Schmelztemperatur in Abhängigkeit von ihres GC- bzw. AT-Gehalts. Als Grundlage für die Optimierung wird häufig die folgende Gleichung verwendet:

$$T_m = (\text{Anzahl von A+T}) \times 2^\circ\text{C} + (\text{Anzahl von G+C}) \times 4^\circ\text{C}$$

Die optimale Annealing-Temperatur liegt meistens 3-5°C unter diesem Ausgangswert und wurde experimentell ermittelt.

PCR-Programm:

	94°C	Denaturierung 1	4 min
40 Zyklen:	94°C	Denaturierung 2	30 sec
	58-68°C	Primeranlagerung (Annealing)	2 min
	72°C	Extension	40-50 Sek. + 1 Sek./Zyklus
Final-extension-Zyklus:	72°C	Elongation	7 min
	04°C	Lagerung	konstant

2.3.10 Zytokin-Nachweis mittels PCR und Gelelektrophorese

Die nachzuweisenden Zytokine wurden jeweils mit einem spezifischen Primer nachgewiesen. Für die verschiedenen Primer wurden experimentell optimierte Annealing-Temperaturen und PCR-Zyklen verwendet.

Annealing-Temperatur und PCR-Zyklen der verschiedenen Primer:

- **β-Actin** = 68°C 35 Zyklen
- **IL-2** = 63°C 40 Zyklen
- **IL-2-Rezeptor** = 63°C 40 Zyklen
- **IL-5** = 60°C 40 Zyklen
- **IL-6** = 68°C 40 Zyklen
- **IL-10** = 58°C 35 Zyklen
- **IFN-γ** = 58°C 40 Zyklen

Die PCR-Produkte wurden in einem 1,5%-igen Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Hierzu wurde die entsprechende Menge Agarose in TAE-Puffer unter Erhitzen gelöst und mit 0,4 µg/ml Ethidium-Bromid versetzt.

Das noch flüssige Gel wurde in einen gereinigten Gelträger gegossen. Nach Polymerisierung des Gels wurde es in die Pufferkammer eingesetzt und der Kamm gezogen. Als Elektrophorese-Gerät wurde eine PCR-Kammer, Gelplatte und Kamm (Bio-Rad, München, Deutschland) sowie eine Spannungsquelle PowerPac 300 (Bio-Rad, München, Deutschland) verwendet. Die Laufbedingungen waren in allen Ansätzen gleich. Zunächst erfolgte ein kurzer Vorlauf für 5 Minuten bei 25 - 40 Volt, damit die gesamte Probe aus der Geltasche in das Gel einlaufen konnte. Dann wurden die DNA-Fragmente bei konstanter Spannung von 100 - 120 V und 60 Minuten separiert. Als Laufpuffer wurde TAE-Puffer verwendet. Als Molekulargewichtsmarker wurde die 100 bp DNA-Ladder der Firma New England Biolabs eingesetzt.

2.3.10.1 Auswertung der Gel-Elektrophorese

Die Ethidium-Bromid-Fluoreszenz, deren Intensität der Menge an PCR-Produkt entspricht, wurde mit einer elektronischen Kamera visualisiert. Hierzu wurde unter UV-Licht (8 mV/m²) mit einer PC-gestützten Kamera eine Aufnahme gespeichert. Anschließend wurde mittels des WinEASY-Programms (Herolab, Wiesloch, Deutschland) das Verhältnis der Fluoreszenz-Intensität der PCR-Produkte, von der Proben-DNA und der definierten Konzentration des Kontrollfragments (KF), gemessen. Unter Verwendung der bekannten Kontroll-Fragment-Konzentration konnte die relative cDNA-Konzentration in der Ausgangs-Probe ermittelt werden.

2.4 Statistische Auswertung

Sämtliche ermittelten Zahlenwerte wie Laborwerte (Serumenzyme (Amylase / Lipase), Zellinfiltration (Zellen/m²) und bestimmte Prozentwerte (Durchflusszytometrie / kompetitive RT-PCR / Pankreasgangdilatation) wurden der statistischen Analyse unterzogen. Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD) wurden mit Hilfe von Microsoft Excel ermittelt. Der statistische Vergleich zwischen den Versuchsgruppen wurde mittels nicht parametrischer Signifikanztests (Mann-Whitney-U-Test bzw. Wilcoxon-Test) durchgeführt. Als Signifikanzniveau wurde ein p-Wert <0,05 = signifikant festgelegt, Hochsignifikanz wurde bei p <0,01 angenommen. Bei einem p-Wert <0,10 wurde eine Tendenz angenommen, während p>0,10 als nicht signifikant (n.s.) bewertet wurde.

3 Ergebnisse

3.1 Ergebnisse der makroskopischen Auswertung

Das DBTC-Pankreatitis-Modell ermöglicht durch die Injektion definierter Mengen von Dibutyl-Zinn-Dichlorid (DBTC) die Induktion entweder einer **akuten Pankreatitis (aP = 4 mg DBTC/kg KG)** oder einer **chronischen Pankreatitis (cP = 8 mg DBTC/kg KG)**. Diese beiden Entitäten wurden bereits ausführlich charakterisiert und publiziert ^(80 / 89). Die eigenen Untersuchungen zeigten, dass es nach Gabe von 4 mg DBTC/kg KG zu keiner wesentlichen Beeinträchtigung des Allgemeinzustandes der Tiere kam. Laparoskopisch konnte v.a. in der ersten Krankheitswoche eine moderate ödematöse Schwellung des Pankreas beobachtet werden, die sich im weiteren Verlauf zurückbildete. Pankreasgangstauungen wurden zu keinem Zeitpunkt beobachtet.

Im Gegensatz dazu war der Allgemeinzustand der Ratten nach der Gabe von 8 mg DBTC/kg KG bereits nach wenigen Stunden deutlich beeinträchtigt. Innerhalb von etwa zwei Wochen entwickelte sich ein generalisierter Ikterus. Ein makroskopisch sichtbares Merkmal einer chronischen Pankreatitis war die Ausbildung einer teilweise sehr deutlich ausgeprägten Dilatation des Pankreas-Gallenganges (definiert als Dilatation >4 mm), wie in **Abb. 16** im rechten Bildteil deutlich zu erkennen ist.

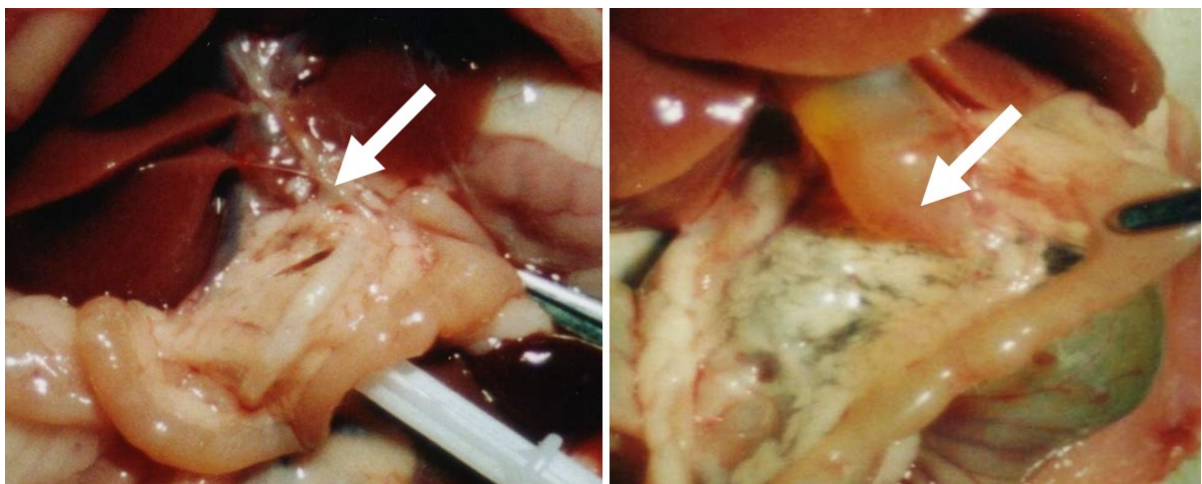


Abb. 16: Pankreasgang-Stauung

Die Pankreasgang-Stauung (definiert als Gangdilatation >4 mm) war in den Vorversuchen nur in der chronischen DBTC-Pankreatitis (8 mg DBTC/kg KG → **cP**) nachweisbar gewesen, während die akute DBTC-Pankreatitis (4 mg DBTC/kg KG → **aP**) keine makroskopisch nachweisbaren Gangerweiterung zeigte (links). Nach Transfer von Lymphozyten aus Tieren mit chronischer DBTC-Pankreatitis auf Tiere mit akuter DBTC-Pankreatitis an Tag 4 konnte auch in der Gruppe der Tiere, die diesen Transfer erhielten (**aP*+LT***), zu einem hohen Prozentsatz eine makroskopisch sichtbare Pankreasgang-Stauung (rechts) nachgewiesen werden.

Wie in **Abb. 17** dargestellt, ergaben sich durch den Lymphozyten-Transfer grundlegende Veränderungen im Vergleich zu den vorher charakterisierten Verläufen der DBTC-Pankreatitis:

- In der Gruppe der **aP** war zu keinem der Beobachtungszeitpunkte (14 / 21 / 28 Tage) eine Pankreasgangstauung zu beobachten (n=0/6). Auch Kontrollen nach dem Transfer von Lymphozyten auf unbehandelte Tiere (**0-LT**) (n=0/6) oder Tiere mit aP und Transfer von Lymphozyten von gesunden Ratten (**aP+LT-0**) (n=0/6) wiesen zu keinem Zeitpunkt einen dilatierten Pankreasgang auf.

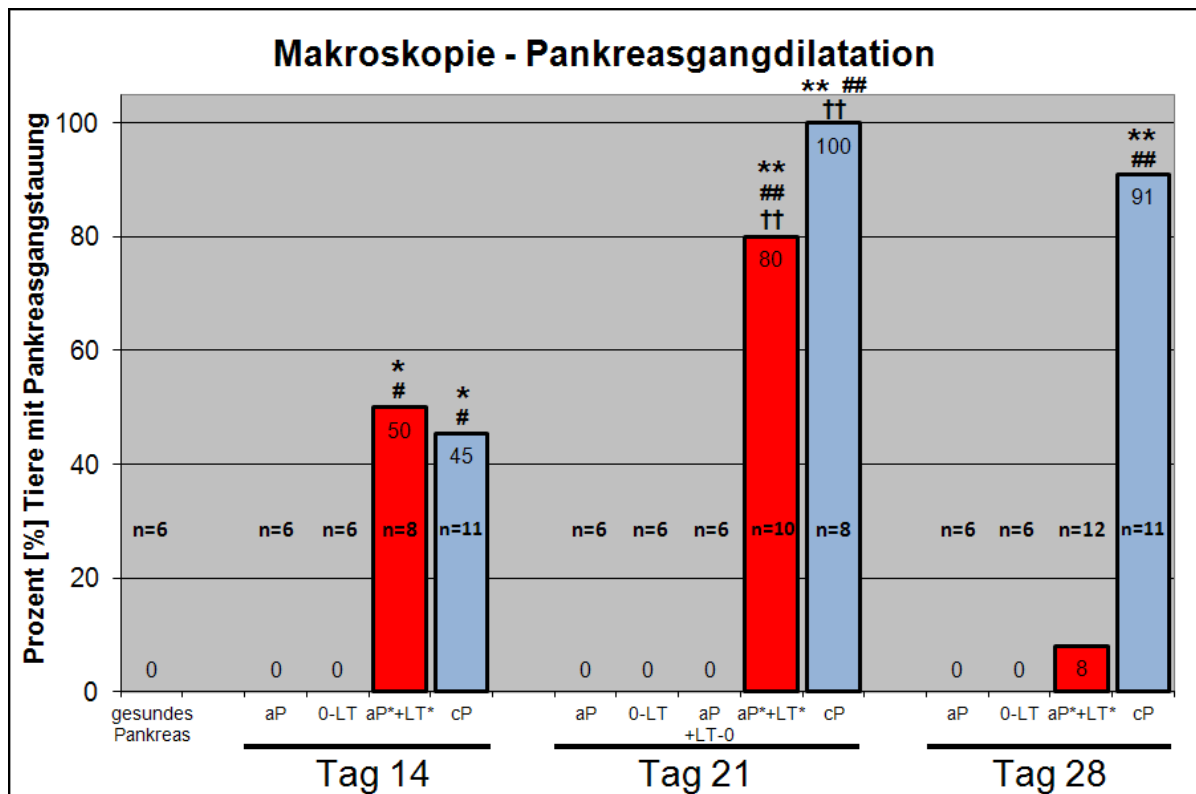


Abb. 17: Transfer von Lymphozyten bewirkt eine makroskopisch sichtbare Pankreasgangstauung

Gesunden Ratten wurde durch die Gabe von DBTC eine Pankreatitis induziert (4 mg DBTC/kg KG → **aP** / 8 mg DBTC/kg KG → **cP**). Von Tieren mit chronischer DBTC-Pankreatitis wurden mononukleäre Zellen extrahiert (Tag 28) und in Tiere mit einer akuten DBTC-Pankreatitis (Tag 4) transferiert (**aP*+LT***). Zu den Beobachtungszeitpunkten (14 / 21 / 28 Tage) wurden die Tiere getötet, die Pankreata entnommen und die Pankreasgangweite bestimmt. Eine Gangweite >4 mm wurde als Pankreasgangstauung definiert. Angegeben ist der prozentuale Anteil der Pankreasgangstauungen aus n unabhängigen Versuchen. *p<0,05, **p<0,01 im Vergleich zum **gesunden Pankreas**; statistischer Vergleich zur aP aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht gezeigt, aber Ergebnisse entsprechen dem Vergleich zum **gesunden Pankreas**; #p<0,05, ##p<0,01 im Vergleich zu **0-LT** des jeweiligen Zeitpunkts; †p<0,05, ††p<0,01 im Vergleich zu **aP+LT-0** (nur d21); (Mann-Whitney-Test).

- Wurden jedoch mononukleäre Zellen von Ratten mit chronischer DBTC-Pankreatitis (Tag 28) auf Tiere mit aP übertragen (**aP*+LT***), war nach 14 Tagen in 50% (n=4/8) und nach

21 Tagen in 80% (n=8/10) der Fälle eine Gangerweiterung nachweisbar. Diese Daten werden in **Abb. 17** (rote Säulen) dargestellt. Hier zeigt sich eine maximale Ausprägung der Pankreasgangstauung zum Beobachtungstag 21, im weiteren Verlauf nahm die Zahl der Tiere mit Gangstauung wieder ab und betrug nach 28 Tagen nur noch ca. 8 % (1/12).

- Bezüglich der **cP** ergab sich zu den Beobachtungstagen 14 und 21 ein mit der **aP*+LT***-Gruppe vergleichbar hoher Anteil an Pankreasgangstauungen. Der Anteil von Tieren mit Dilatation des Pankreasganges blieb auch im weiteren Verlauf der Beobachtung deutlich erhöht.

Bisher war die Pankreasgangstauung nur im Verlauf der chronischen DBTC-Pankreatitis (8 mg DBTC/kg KG) nachweisbar. Die eigenen Ergebnisse zeigen nun, dass auch durch den Transfer mononukleärer Zellen eine zunehmende Schädigung des Pankreasorgans im Sinne eines chronischen Verlaufes im Vergleich zur akuten DBTC-Pankreatitis (4 mg DBTC/kg KG) hervorgerufen wird.

3.2 Ergebnisse der Histologie (HE-Färbung)

Die Entzündungsreaktion der akuten DBTC-Pankreatitis nach Applikation von 4 mg DBTC/kg KG war gekennzeichnet durch ein interstitielles Ödem und umschriebene periduktale sowie perivaskuläre Infiltrationen mit mononukleären Zellen. Die histologischen Veränderungen blieben jedoch auf die erste Woche nach der Krankheit beschränkt⁽⁸⁰⁾ und diese milde akute Pankreatitis war nach etwa 14 Tagen mit einer *restitutio ad integrum* ausgeheilt.

Im Gegensatz dazu kam es nach dem Transfer von Lymphozyten aus Tieren mit einer chronischen DBTC-Pankreatitis in Tiere mit einer leichten Pankreasschädigung (**aP*+LT***) zu deutlich erkennbaren Azinus-Zell-Schäden mit Zell-Untergang (Nekrose) und Ersatz durch Bindegewebe (Fibrose), sowie zur Ausbildung tubulärer Komplexe (Atrophie der exokrinen Drüsen und zurückbleibendes Gangsystem) (**Abb. 18**). Diese Merkmale entsprechen einer „duktaalen Transformation“ als histologisches Merkmal der chronischen Pankreatitis. Besonders auffällig war eine Zunahme des periduktalen Bindegewebes im Sinne einer fokalen Fibrose (**Abb. 18-20**).

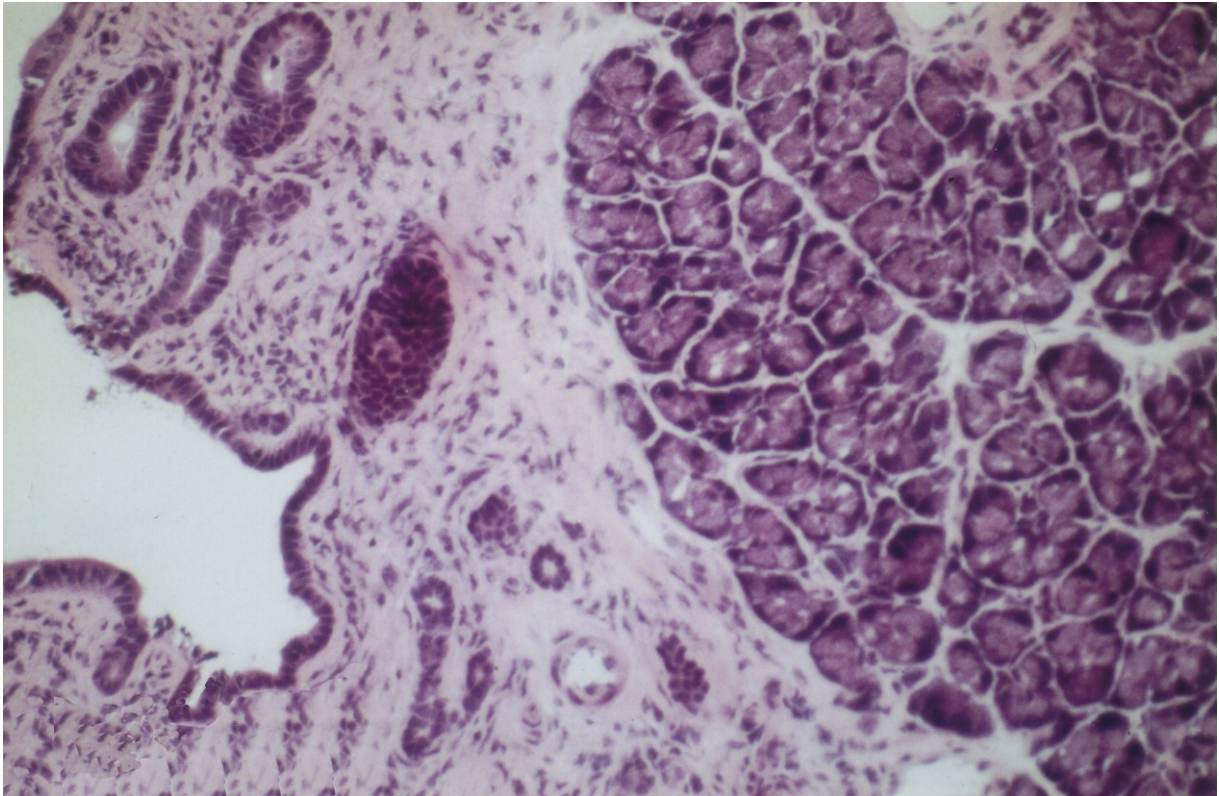


Abb. 18: Zunahme des periduktalen Bindegewebes (Pfeil) an Tag 14 bei aP*+LT*-Tieren

In Ratten wurde durch 4 mg DBTC/kg KG eine akute Pankreatitis induziert, an Tag 4 erhielten diese Tiere einen Transfer von mononukleären Zellen aus Lymphknoten / Milz / Blut von Tieren mit chronischer DBTC-Pankreatitis (Tag 28). An Tag 14 wurden diese **aP*+LT***-Tiere getötet, das Pankreas entnommen und histologisch aufgearbeitet. Der hier dargestellte Gewebsschnitt zeigt eine deutliche Zunahme des periduktalen Bindegewebes bei **aP*+LT***-Tieren, Zeitpunkt Tag 14, (Hämatoxylin-Eosin-(HE)-Färbung), Originalvergrößerung x 200.

Die Ausprägung dieser Veränderungen korrelierte mit der Stärke der Gang-Dilatation. Dementsprechend zeigten 21 Tage nach der Pankreatitis-Induktion und Transfer mononukleärer Zellen 80% der **aP*+LT***-Ratten histologische Charakteristika einer chronischen Pankreatitis (**Abb. 19**).

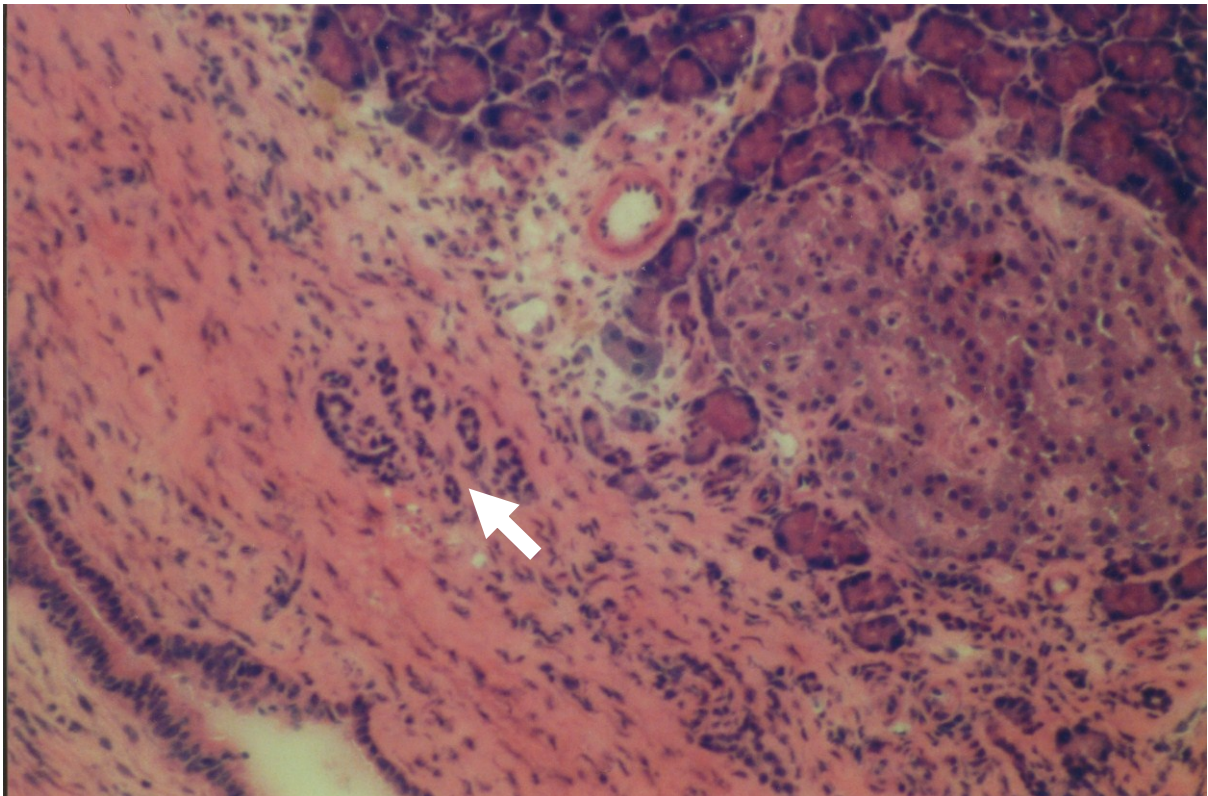


Abb. 19: Ausbildung tubulärer Komplexe (Pfeil) an Tag 21 bei aP*+LT*-Tieren

In Ratten wurde durch 4 mg DBTC/kg KG eine akute Pankreatitis induziert, an Tag 4 erhielten diese Tiere einen Transfer von Lymphozyten aus Lymphknoten / Milz / Blut von Tieren mit chronischer DBTC-Pankreatitis (Tag 28). An Tag 21 wurden diese **aP*+LT***-Tiere getötet, das Pankreas entnommen und histologisch aufgearbeitet. Der hier dargestellte Gewebsschnitt zeigt neben einer deutliche Zunahme des periduktalen Bindegewebes auch Zeichen der Destruktion von Azinuszellen und weiterhin bestehendem Gangsystem (= Tubuläre Komplexe) (Pfeil) bei **aP*+LT***-Tieren, Zeitpunkt Tag 21, (Hämatoxylin-Eosin-(HE)-Färbung), Originalvergrößerung x 200.

Diese Veränderungen waren ebenfalls auch zum Beobachtungszeitpunkt Tag 28 nach Pankreatitis-Induktion und Transfer von mononukleären Zellen nachweisbar (**Abb. 20**).

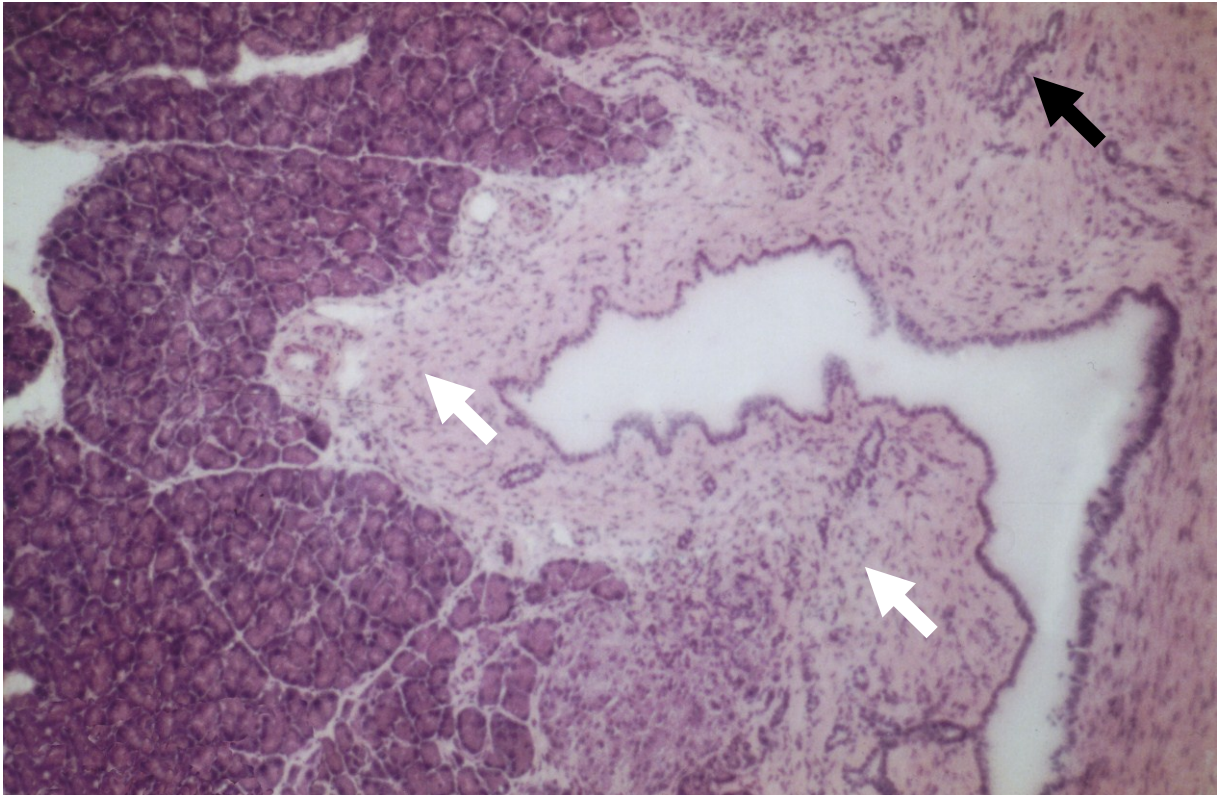


Abb. 20: Zunahme des periduktalen Bindegewebes und tubuläre Komplexe an Tag 28 bei aP*+LT*-Tieren

Durch 4 mg DBTC/kg KG wurde in Ratten eine akute DBTC-Pankreatitis induziert. 4 Tage später erhielten diese Tiere einen Transfer von Lymphozyten aus Lymphknoten / Milz / Blut von Tieren mit chronischer DBTC-Pankreatitis (Tag 28). An Tag 28 wurden diese **aP*+LT***-Tiere getötet, das Pankreas entnommen und histologisch aufgearbeitet. Der hier dargestellte Gewebsschnitt zeigt neben einer deutliche Zunahme des periduktalen Bindegewebes (weißer Pfeil) auch Zeichen der Destruktion von Azinuszellen und weiterhin bestehendem Gangsystem (= Tubuläre Komplexe / schwarzer Pfeil) bei **aP*+LT***-Tieren, Zeitpunkt Tag 28, (Hämatoxylin-Eosin-(HE)-Färbung), Originalvergrößerung x 200.

In den LT-Kontroll-Versuchen (**aP+LT-0** und **0-LT**) wurden keine Zunahme des periduktalen Bindegewebes und keine Zeichen einer Destruktion von Azinuszellen (tubuläre Komplexe) gefunden. Die Organstruktur zeigte sich weitgehend unverändert.

Im deutlichen Gegensatz dazu war die chronische DBTC-Pankreatitis (**cP**) durch eine histologisch deutlich sichtbare Destruktion des Organs in Form von tubulären Komplexen sowie Zunahme des periduktalen Bindegewebes gekennzeichnet (**Abb. 21**).

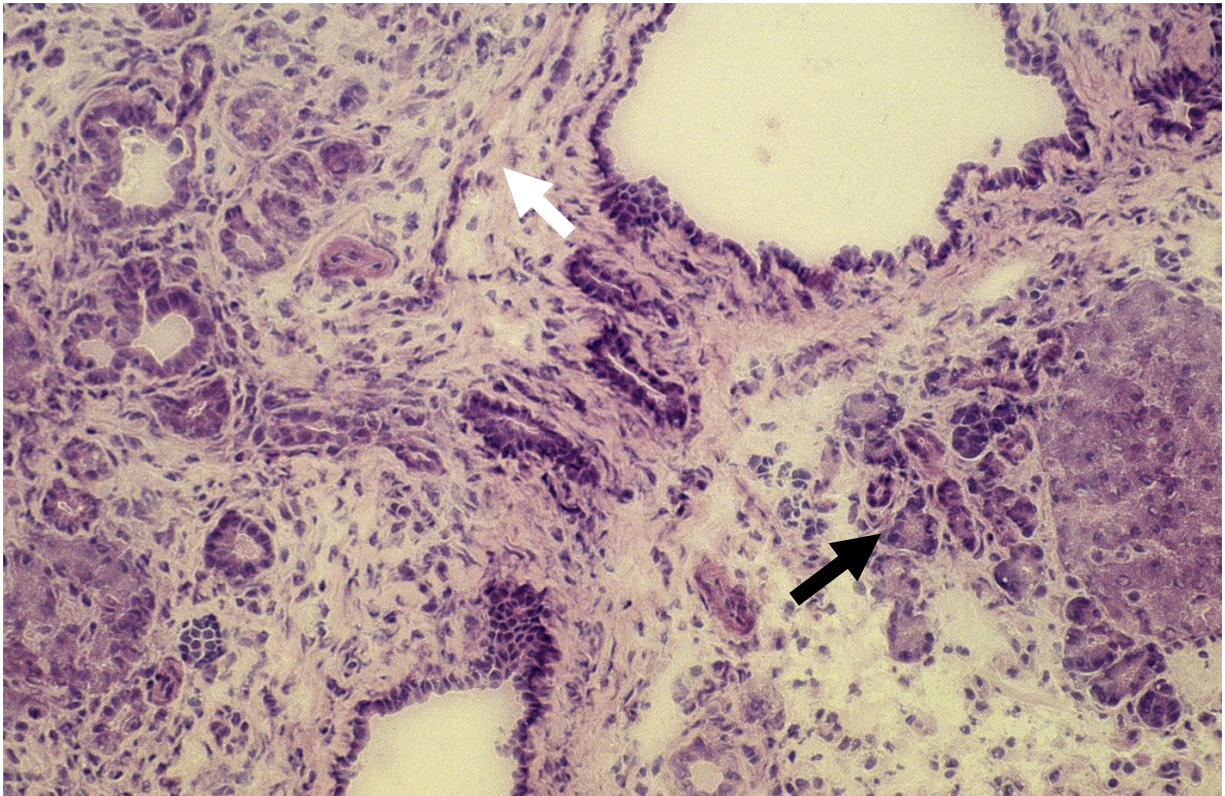


Abb. 21: Tubuläre Komplexe (Pfeil) und vermehrtes periduktales Bindegewebe bei chronischer DBTC-Pankreatitis an Tag 28

Durch 8 mg DBTC/kg KG wurde in Ratten eine chronisch verlaufende Pankreatitis induziert. An Tag 28 wurden diese **cP**-Tiere getötet, das Pankreas entnommen und histologisch aufgearbeitet. Der hier dargestellte Gewebsschnitt zeigt neben einer deutliche Zunahme des periduktalen Bindegewebes (weißer Pfeil) auch eine deutliche Destruktion von Azinuszellen und weiterhin bestehendem Gangsystem (= Tubuläre Komplexe / schwarzer Pfeil) bei **cP**-Tieren, Zeitpunkt Tag 28, (Hämatoxylin-Eosin-(HE)-Färbung), Originalvergrößerung x 200.

Die Daten der histologischen Aufarbeitung zeigen somit, dass durch den Transfer mononukleärer Zellen die milde akute DBTC-Pankreatitis einen chronischen Verlauf nimmt, also der Verlauf der milden 4 mg DBTC-Pankreatitis mit Lymphozytentransfer (**aP*+LT***) dem Verlauf der chronischen DBTC-Pankreatitis ohne Transfer entspricht.

3.3 Ergebnisse der Immunhistochemie (IHC)

Die Analyse der Leukozyteninfiltration in den Ratten-Pankreas-Geweben erfolgte mittels Immunhistochemie. Unter Verwendung spezifischer monoklonaler Antikörper (mAK) wurden CD4⁺-, CD8⁺-, CD25⁺-Zellen, Granulozyten, Makrophagen und T-Zell-Rezeptor-positive Zellen dargestellt.

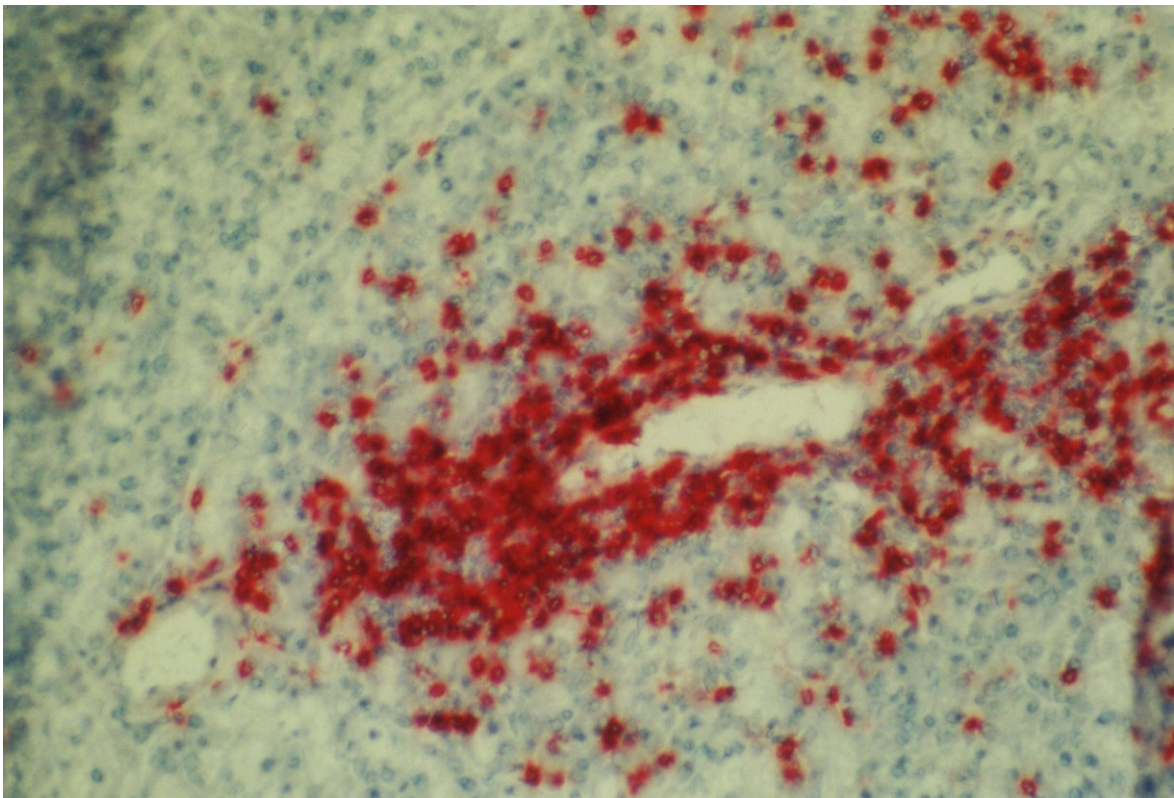


Abb. 22: Immunhistochemische Färbung von CD8⁺-T-Lymphozyten an Tag 21 bei aP*+LT*-Tieren

Nach Induktion einer akuten DBTC-Pankreatitis (4 mg DBTC/kg KG → aP) erhielten diese Ratten 4 Tage später einen Transfer von Lymphozyten, die aus Lymphknoten / Milz / Blut von Tieren mit einer chronischen DBTC-Pankreatitis (8 mg DBTC/kg KG → cP) Tag 28 extrahiert wurden. Nach Transfer wurde die Ratten (aP*+LT*) an Tag 21 getötet, die Pankreata entnommen und in den Gewebsschnitten die Infiltration mit CD8⁺-Zellen durch immunhistochemische Färbung nachgewiesen. Hier zeigte sich eine v.a. perivasaal / periduktal nachweisbare Verteilung, aP*+LT*-Tiere, Zeitpunkt Tag 21, Originalvergrößerung x 200.

Die Verteilung der angefärbten Leukozyten im Gewebe war sehr unterschiedlich. Eine erhöhte Infiltration war v.a. periduktal und perivasaal auffällig (**Abb. 22**). Im restlichen Gewebe war weitgehend nur eine leicht erhöhte Leukozyteninfiltration festzustellen (**Abb. 23**). Aufgrund dieser Ausgangslage spiegeln die errechneten Durchschnittswerte (Zellen/m²) die wahre Zellverteilung nur unvollkommen wieder. Zur Vergleichbarkeit der einzelnen Gruppen war die Berechnung der Mittelwerte dennoch erforderlich.

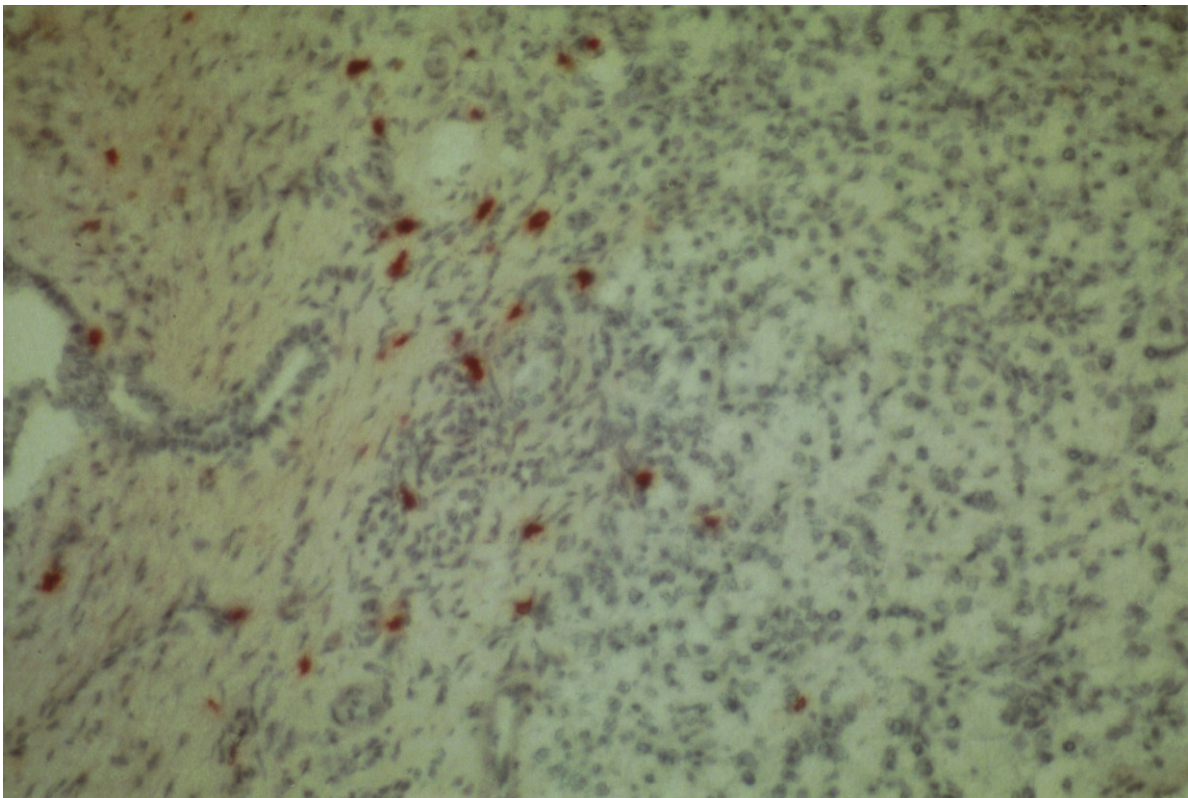


Abb. 23: Immunhistochemische Färbung von CD8⁺ T-Lymphozyten an Tag 28 bei aP*+LT*-Tieren

Nach Induktion einer akuten Pankreatitis (4 mg DBTC/kg KG → **aP**) erhielten diese Ratten 4 Tage später einen Transfer von Lymphozyten, die aus Lymphknoten / Milz / Blut von Tieren mit einer chronischen DBTC-Pankreatitis (8 mg DBTC/kg KG → **cP**) Tag 28 extrahiert wurden. Nach Transfer wurde diese **aP*+LT***-Ratten an Tag 28 getötet, die Pankreata entnommen und in den Gewebsschnitten die Infiltration mit CD8⁺-Zellen durch immunhistochemische Färbung (IHC) nachgewiesen. Hier zeigte sich die inhomogene Verteilung der Lymphozyten im Pankreasgewebe mit nachweisbaren Zellen in der Nähe des Pankreasganges und einer deutlich geringeren Infiltration des restlichen Pankreas, **aP*+LT***-Tiere, Zeitpunkt Tag 28, Originalvergrößerung x 200.

Die ermittelte Zellzahl/mm² der immunhistochemisch angefärbten infiltrierenden mononukleären Zellen in den einzelnen Versuchsansätzen wurde an den verschiedenen Beobachtungszeitpunkten (0 / 14 / 21 / 28 d) verglichen. Als Kontrollen dienten gesunde Ratten (**gesundes Pankreas**) und die LT-Kontrollen **0-LT** (Tag 14, 21, 28) und **aP+LT-0** (Tag 21). Darüber hinaus wurden zum Vergleich der Ergebnisse des Lymphozyten-Transfers (**aP*+LT***) Gewebe von Tieren nach Gabe von 8 mg DBTC/kg KG (**cP**) mit einbezogen. Auf die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung wird im weiteren Verlauf eingegangen.

3.3.1 CD4⁺-T-Lymphozyten

Die **Abb. 24** zeigt die Zellinfiltration des Pankreasgewebes mit CD4⁺-T-Lymphozyten. Im unbehandelten Pankreas (**gesundes Pankreas**) waren nur vereinzelte CD4⁺-Zellen im immunhistochemisch gefärbten Gewebe nachweisbar. Die LT-Kontrollen (**0-LT / aP+LT-0**) ergaben an den untersuchten Zeitpunkten Tag 14, 21 und 28 nur leicht erhöhte Werte. Im Gegensatz dazu war die Zahl der CD4⁺-Zellen in der Lymphozyten-Transfergruppe mit akuter DBTC-Pankreatitis (**aP*+LT***) deutlich erhöht (rote Säulen), wobei die Infiltration am Tag 21 ein Maximum markierte und zu Tag 28 wieder abfiel (**Abb. 24**). Einen ähnlichen Verlauf der CD4⁺-Zellen im Gewebe ergaben die Untersuchungen der mittels 8 mg DBTC/kg KG induzierten **cP**, wo sich ebenfalls ein Maximum an Tag 21 und im Verlauf ein deutlicher Rückgang der nachweisbaren Infiltration zeigt. Die Anzahl der nachweisbaren Zellen ist bei der **cP** deutlich höher als in den gezeigten Vergleichsgruppen.

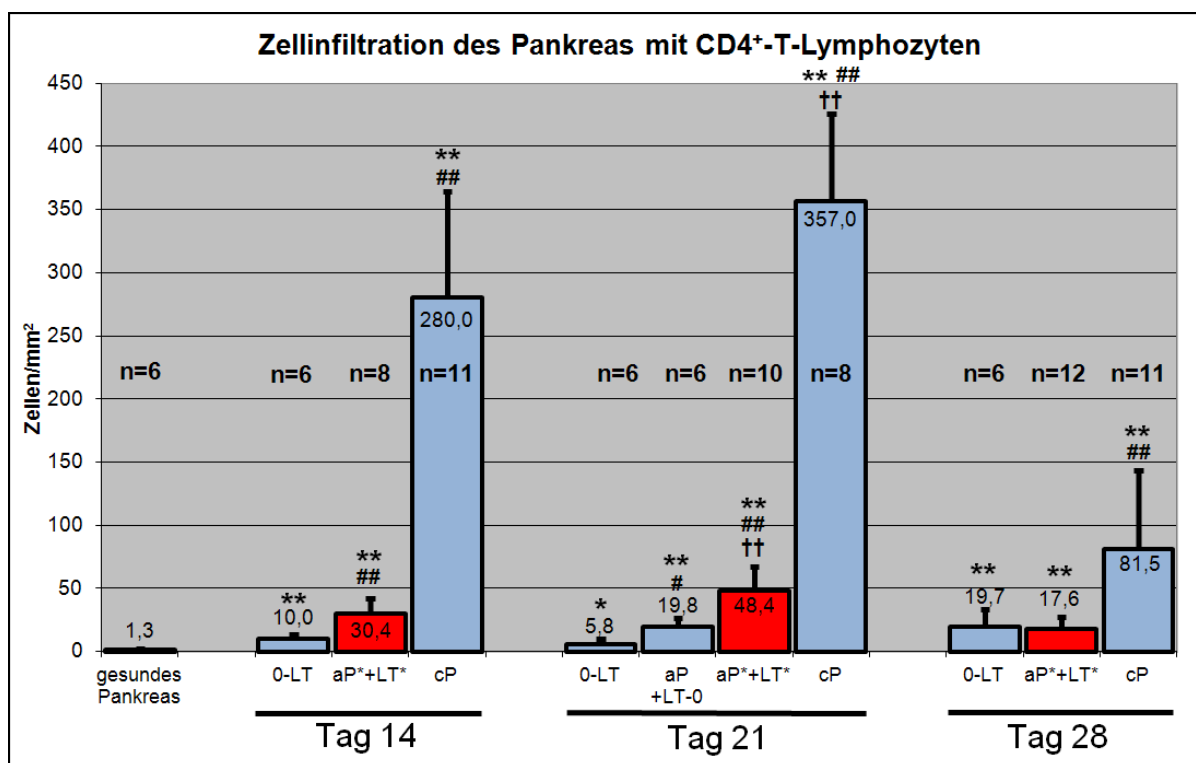


Abb. 24: Erhöhte Infiltration des Pankreasgewebes mit CD4⁺-T-Lymphozyten (IHC)

Zur Induktion einer Pankreatitis wurde gesunden Ratten DBTC intravenös appliziert (4 mg DBTC/kg KG → **aP** / 8 mg DBTC/kg KG → **cP**). Für den Lymphozytentransfer wurden mononukleäre Zellen von Tieren mit chronischer DBTC-Pankreatitis extrahiert (Tag 28) und in Tiere mit einer akuten DBTC-Pankreatitis (Tag 4) transferiert. Anschließend wurden diese Tiere zu den Beobachtungszeitpunkten (14 / 21 / 28 Tage) getötet, die Pankreata entnommen und immunhistochemisch die im Gewebe vorhandenen CD4⁺-Zellen gefärbt. Angegeben sind die Mittelwerte +/- SD aus n unabhängigen Versuchen. *p<0,05, **p<0,01 im Vergleich zum **gesunden Pankreas**; #p<0,05, ##p<0,01 im Vergleich zu **0-LT** des jeweiligen Zeitpunkts; †p<0,05, ††p<0,01 im Vergleich zu **aP+LT-0** (nur d21); (Mann-Whitney-Test).

Die Infiltration mit CD4⁺-T-Lymphozyten ist v.a. zu Beginn nach Pankreatitis-Induktion signifikant erhöht und nimmt im weiteren Beobachtungszeitraum ab, somit scheinen die CD4⁺-T-Zellen eine wichtige Rolle v.a. zu Beginn des Prozesses zu spielen.

3.3.2 CD8⁺-T-Lymphozyten

Im unbehandelten Pankreas (**gesundes Pankreas**) waren nur wenige CD8⁺-T-Lymphozyten im gefärbten Gewebe nachweisbar. Die Lymphozytentransfer-Kontrollen (**0-LT** / **aP+LT-0**) ergaben zu den beobachteten Zeitpunkten eine im Vergleich zum gesunden Pankreas leicht erhöhte Infiltration. In der Lymphozyten-Transfergruppe (**aP*+LT***) (rote Säulen) war zu Tag 14 eine niedrigere Infiltration als in der **0-LT**-Gruppe nachweisbar. Im Verlauf der Beobachtung nahm die Infiltration deutlich zu und erreichte ein Maximum an Tag 21 (**Abb. 25**). Diese maximale Zellinfiltration an Tag 21 und auch die geringe Abnahme zu Tag 28 konnte auch in der Vergleichsgruppe der **cP** nachgewiesen werden. Die Absolutwerte der nachgewiesenen Zellen waren in der **cP**-Gruppe deutlich höher als in allen anderen Gruppen.

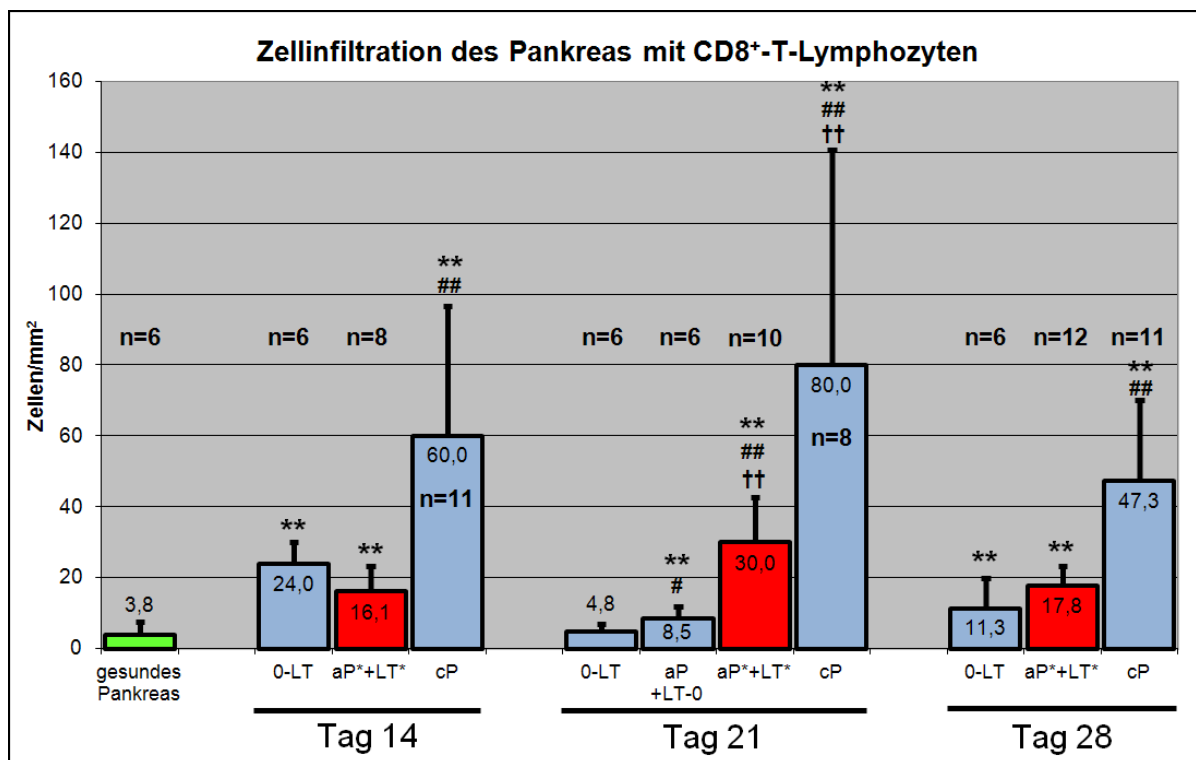


Abb. 25: Infiltration des Pankreasgewebes mit CD8⁺-T-Lymphozyten (IHC)

Gesunden Ratten wurde durch die Gabe von DBTC eine Pankreatitis induziert (4 mg DBTC/kg KG → **aP** / 8 mg DBTC/kg KG → **cP**). Von Tieren mit chronischer DBTC-Pankreatitis wurden mononukleäre Zellen aus Lymphknoten / Milz / Blut extrahiert (Tag 28) und in Tiere mit einer akuten DBTC-Pankreatitis (Tag 4) transferiert (**aP*+LT***). Zum Beobachtungszeitpunkt Tag 28 wurden die Tiere getötet, die Pankreata entnommen und in den Gewebsschnitten immunhistochemisch die Infiltration mit CD8⁺-Zellen gefärbt. Angegeben sind die Mittelwerte +/- SD aus n unabhängigen Versuchen.

*p<0,05, **p<0,01 im Vergleich zum **gesunden Pankreas**; #p<0,05, ##p<0,01 im Vergleich zu **0-LT** des jeweiligen Zeitpunkts; †p<0,05, ††p<0,01 im Vergleich zu **aP+LT-0** (nur d21); (Mann-Whitney-Test).

Somit scheinen auch die CD8⁺-T-Lymphozyten eine Rolle im Entzündungsprozess der durch 4 mg DBTC/kg KG und Transfer mononukleärer Zellen behandelten Ratten (**aP*+LT***) zu spielen, da das Muster der Zellinfiltration mit CD8⁺-T-Zellen im Verlauf dem der chronischen DBTC-Pankreatitis ähnelt.

3.3.3 CD25⁺-T-Lymphozyten

Die Zellinfiltration des Pankreasgewebe mit CD25⁺-T-Lymphozyten im **gesunden Pankreas** betrug $5,3 \pm 3,0$ Zellen/mm². Im Vergleich dazu zeigten die LT-Kontrollen (**0-LT** / **aP+LT-0**) zu den festgelegten Beobachtungszeitpunkten eine initial erhöhte, aber im Verlauf abnehmende Zellinfiltration, ebenso wie die Zellinfiltration der **aP*+LT***-Gruppe (rote Säulen). Dahingegen konnte in der Gruppe der **cP** ein deutliches Maximum an Tag 21 nachgewiesen werden. Die Daten sind in **Abb. 26** zusammengefasst.

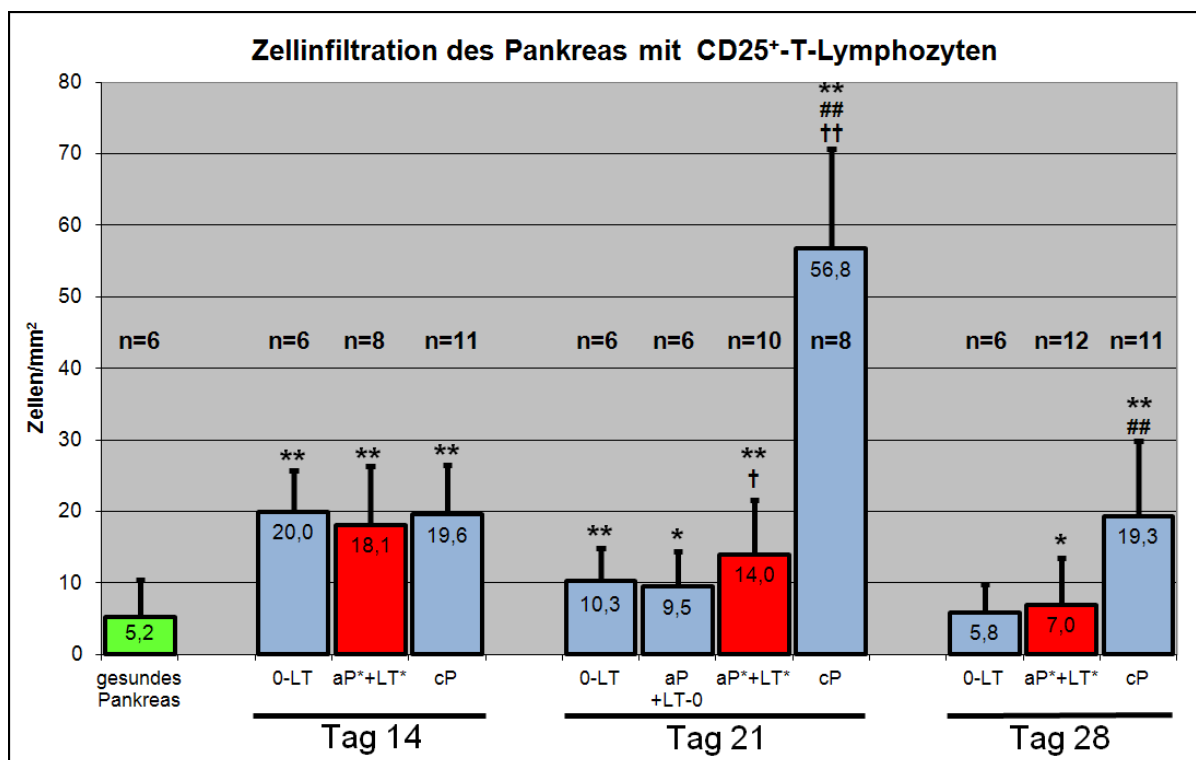


Abb. 26: Infiltration des Pankreasgewebes mit CD25⁺-Lymphozyten (IHC)

Zur Induktion einer Pankreatitis wurde gesunden Ratten DBTC intravenös appliziert (4 mg DBTC/kg KG → **aP** / 8 mg DBTC/kg KG → **cP**). Für den Lymphozytentransfer wurden mononukleäre Zellen von Tieren mit chronischer DBTC-Pankreatitis aus Lymphknoten / Milz / Blut extrahiert (Tag 28) und in Tiere mit einer akuten DBTC-Pankreatitis (Tag 4) transferiert. Anschließend wurden diese Tiere zu den Beobachtungszeitpunkten (14 / 21 / 28 Tage) getötet, die Pankreata entnommen und immunhistochemisch die im Gewebe vorhandenen CD25⁺-T-Zellen gefärbt. Angegeben sind die

Mittelwerte \pm SD aus n unabhängigen Versuchen. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ im Vergleich zum **gesunden Pankreas**; # $p < 0,05$ im Vergleich zu **0-LT** des jeweiligen Zeitpunkts; † $p < 0,05$ im Vergleich zu **aP+LT-0** (nur d21); (Mann-Whitney-Test).

Die im Vergleich zu den gesunden Kontrolltieren signifikant erhöhte Expression von CD25 lässt auf eine vermehrte Aktivierung von T-Lymphozyten schließen. Dies unterstützt die Theorie, dass durch den Transfer von Lymphozyten aus **cP**-Tieren eine Veränderung im Sinne einer zumindest temporär verstärkten Entzündungsreaktion im Verlauf der akuten Pankreatitis hervorzurufen ist.

3.3.4 Makrophagen

Im Gewebe der gesunden Kontroll-Gruppe wurden $44,4 \pm 24,5$ Makrophagen/mm² ermittelt. Nach Transfer mononukleärer Zellen (**aP*+LT***) (rote Säulen) stieg die Infiltration mit Makrophagen auf etwa das Dreifache an, in den Kontrollgruppen (**0-LT** / **aP+LT-0**) war dieser Anstieg nicht so ausgeprägt. Im Verlauf des Beobachtungszeitraumes war in allen Gruppen ein Maximum der Zellinfiltration an Tag 21 nachweisbar.

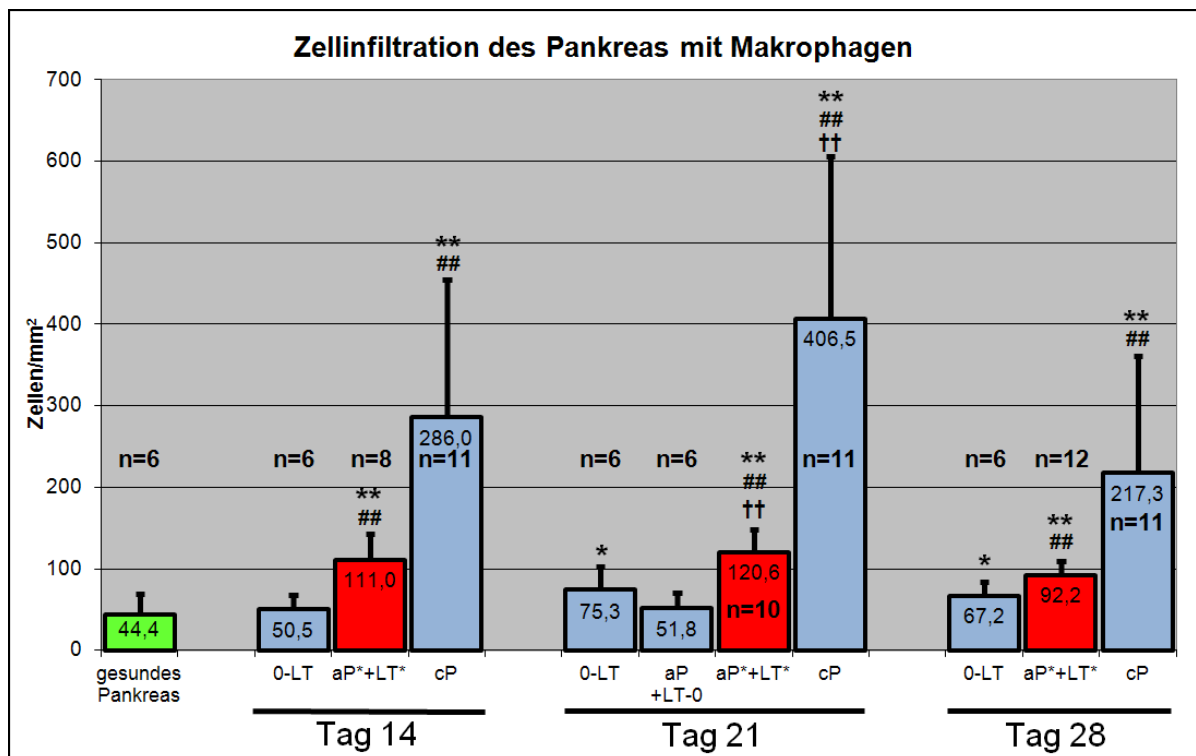


Abb. 27: Infiltration des Pankreasgewebes mit Makrophagen (IHC)

Zur Induktion einer Pankreatitis wurde gesunden Ratten DBTC intravenös appliziert (4 mg DBTC/kg KG → **aP** / 8 mg DBTC/kg KG → **cP**). Für den Lymphozytentransfer wurden mononukleäre Zellen von Tieren mit chronischer DBTC-Pankreatitis aus Lymphknoten / Milz / Blut extrahiert (Tag 28) und in Tiere mit einer akuten DBTC-Pankreatitis (Tag 4) transferiert. Anschließend wurden diese Tiere zu den Beobachtungszeitpunkten (14 / 21 / 28 Tage) getötet, die Pankreata entnommen und

immunhistochemisch die im Gewebe vorhandenen Makrophagen gefärbt. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SD aus n unabhängigen Versuchen. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ im Vergleich zum **gesunden Pankreas**; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ im Vergleich zu **0-LT** des jeweiligen Zeitpunkts; † $p < 0,05$, †† $p < 0,01$ im Vergleich zu **aP+LT-0** (nur d21); (Mann-Whitney-Test).

Der vermehrte Nachweis von Makrophagen deutet auf einen entzündlichen Prozess mit Untergang von Zellen und Organstrukturen hin. Somit ähnelt der Verlauf der Transfergruppe **aP*+LT*** dem einer chronischen Entzündung des Pankreas.

3.3.5 Granulozyten

In den Kontrollen (**gesundes Pankreas** / **0-LT** / **aP+LT-0**) waren allenfalls nur sehr wenige Granulozyten nachweisbar. Auch in der Transfergruppe **aP*+LT*** waren keine Granulozyten im Pankreasgewebe nachweisbar. Im Gegensatz dazu war bei der **cP** eine sehr hohe Infiltration (Tag 21 + Tag 28) zu erheben, an Tag 14 erfolgte aus technischen Gründen keine Bestimmung der Granulozyten-Infiltration.

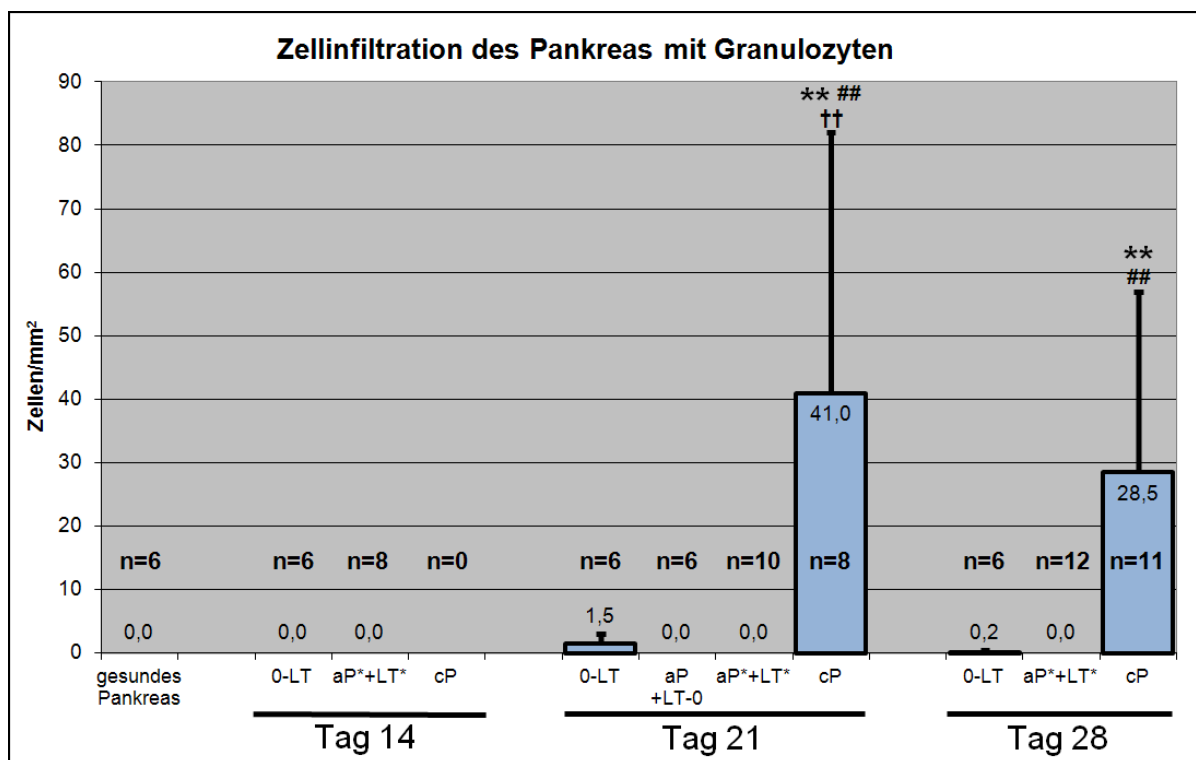


Abb. 28: Infiltration des Pankreasgewebes mit Granulozyten (IHC)

Zur Induktion einer Pankreatitis wurde gesunden Ratten DBTC intravenös appliziert (4 mg DBTC/kg KG → **aP** / 8 mg DBTC/kg KG → **cP**). Für den Lymphozytentransfer wurden mononukleäre Zellen von Tieren mit chronischer DBTC-Pankreatitis aus Lymphknoten / Milz / Blut extrahiert (Tag 28) und in Tiere mit einer akuten DBTC-Pankreatitis (Tag 4) transferiert. Anschließend wurden diese Tiere zu den Beobachtungszeitpunkten (14 / 21 / 28 Tage) getötet, die Pankreata entnommen und immunhistochemisch die im Gewebe vorhandenen Granulozyten gefärbt. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SD aus n unabhängigen Versuchen. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ im Vergleich zum **gesunden Pankreas**; # $p < 0,05$ im Vergleich zu **0-LT** des jeweiligen Zeitpunkts; † $p < 0,05$ im Vergleich zu **aP+LT-0** (nur d21); (Mann-Whitney-Test).

Granulozyten weisen eine deutlich erhöhte Infiltration in der chronischen Pankreatitis auf. Unklar bleibt, warum in allen anderen Gruppen u.a. auch der **aP*+LT***-Gruppe kaum Granulozyten nachweisbar waren.

3.4 Ergebnisse der RT-PCR

Die mRNA-Expression der untersuchten Zytokine wurde mittels der RNA-(RT)-PCR bestimmt. Die Zytokine IFN- γ , IL-2, IL-5, IL-6 und IL-10 sowie IL-2-Rezeptor wurden zu den Zeitpunkten 14, 21 und 28 Tage nach Pankreatitisinduktion im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollgruppen quantifiziert.

3.4.1 Interferon- γ (IFN- γ)

Im Pankreasgewebe von **gesunden Tieren** zeigte sich keine IFN- γ -Expression. Auch in der Kontroll-Gruppe **0-LT** fand sich nur eine geringe Expression zu den Zeitpunkten Tag 14 und Tag 21, während an Tag 28 keine Expression nachweisbar war. Wie in **Abb. 29** dargestellt konnte auch in der Kontrolle **aP+LT-0** keine IFN- γ -Expression nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu ergab sich eine deutlich erhöhte Expression in der **aP*+LT***- Gruppe (rote Säulen) zu allen 3 Beobachtungszeitpunkten im Vergleich zum **Gesunden Pankreas** und auch zu den Kontrollen. Im Pankreasgewebe von Tieren mit **cP** ist eine ca. 100 % höhere Expression nachweisbar.

Die erhöhte IFN- γ -Expression verdeutlicht eine im Pankreasgewebe nachweisbare Entzündungsreaktion, die durch den Transfer von Lymphozyten aus Ratten mit einer chronischen Pankreatitis auf Tiere mit akuter Pankreatitis übertragen wurde.

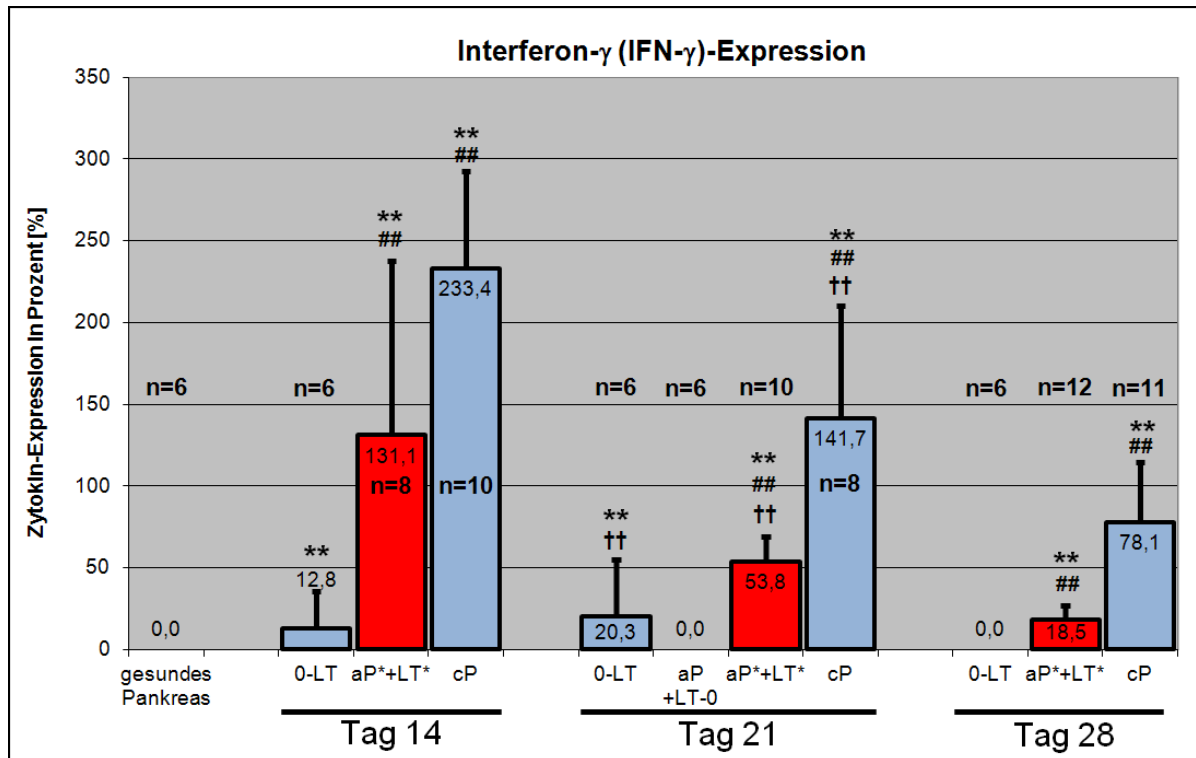


Abb. 29: Übersicht der IFN-γ-Expression in Rattenpankrea

In **gesunden Ratten** wurde durch die intravenöse Gabe von 4 bzw. 8 mg DBTC/kg KG eine akute Pankreatitis (**aP**) bzw. eine chronische Entzündung (**cP**) induziert. Aus Tieren mit einer cP wurden nach 28 Tagen mononukleäre Zellen aus Lymphknoten, Milz und peripherem Blut extrahiert und in Tiere mit einer aP 4 Tage nach Induktion transferiert. Zu den Zeitpunkten 14, 21 und 28 Tage wurden die Tiere getötet, das Pankreas entnommen und aus dem Gewebe die mRNA extrahiert. Hieraus wurde die Expression des Zytokins IFN-γ mittels kompetitiver RT-PCR bestimmt, die Fluoreszenzintensität der PCR-Produkte gemessen und mit Hilfe eines Kontrollfragments normalisiert wurde. 100% entsprechen der Konzentration des Kontrollfragments im jeweiligen Ansatz. Angegeben sind die Mittelwerte +/- SD aus n unabhängigen Versuchen. *p<0,05, **p<0,01 im Vergleich zum **gesunden Pankreas**; #p<0,05, ##p<0,01 im Vergleich zu **0-LT** des jeweiligen Zeitpunkts; †p<0,05, ††p<0,01 im Vergleich zu **aP+LT-0** (nur d21); (Mann-Whitney-Test).

3.4.2 Interleukin-2 (IL-2)

Die Expression von IL-2 war im **gesunden Pankreas** und in den Kontroll-Untersuchungen (**0-LT** / **aP+LT-0**) nur gering nachweisbar, während in der Lymphozyten-Transfergruppe (**aP*+LT***) (rote Säulen) an Tag 14 und Tag 21 jeweils bis zu 10-fach erhöhte Werte zu messen waren. Im Verlauf reduzierte sich die IL-2-Expression. In den untersuchten Pankreasgeweben der **cP** waren ebenfalls eine starke initiale Induktion der IL-2-Expression und dann eine abnehmende Tendenz im Vergleich von Tag 14 zu Tag 28 zu verzeichnen, die prozentualen Werte lagen aber im Vergleich zur Transfergruppe (**aP*+LT***) etwa doppelt so hoch, wie der **Abb. 30** zu entnehmen ist. In der Transfergruppe (**aP*+LT***) und der **cP** war die Expression aber auch an Tag 28 noch deutlich erhöht, während in den Kontrollen bereits kein IL-2 mehr nachweisbar war.

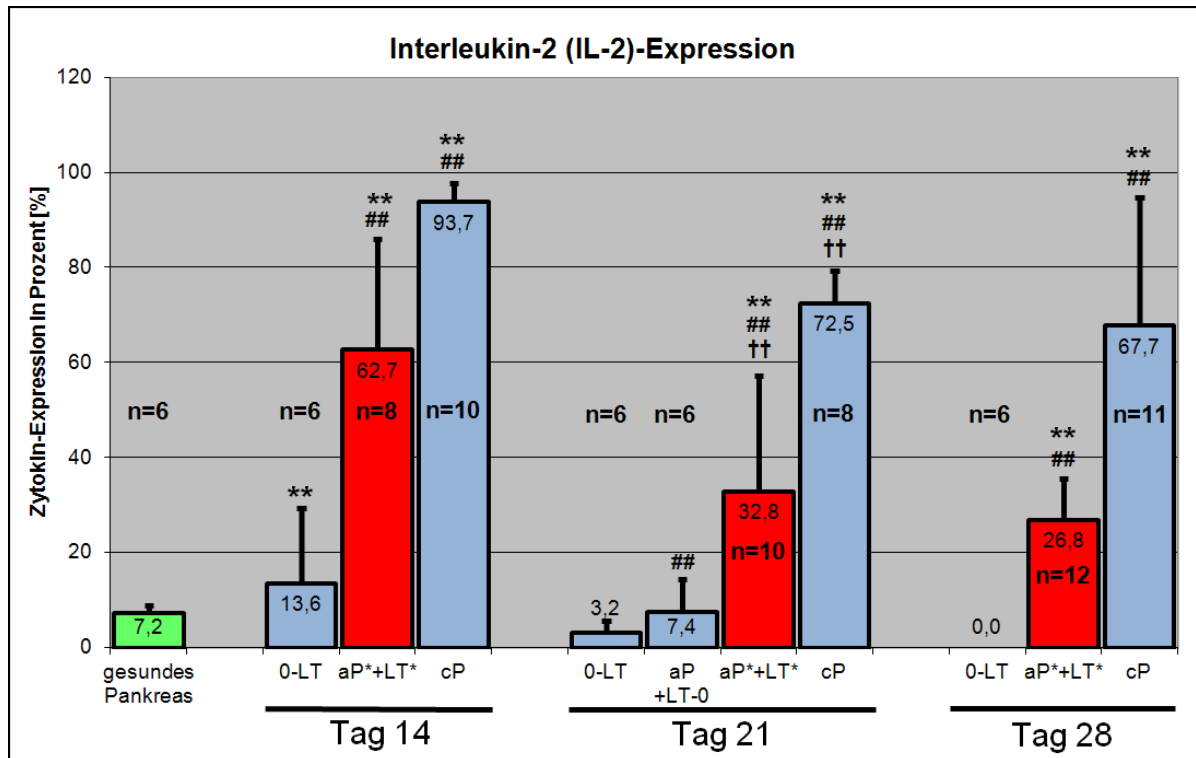


Abb. 30: Übersicht der IL-2-Expression in Rattenpankreatita

Durch die intravenöse Gabe von 8 mg DBTC/kg KG wurde in gesunden Ratten eine chronische Pankreatitis (**cP**) induziert. An Tag 28 nach Induktion wurden von diesen Tieren aus Lymphknoten, Milz und peripherem Blut die mononukleären Zellen extrahiert und auf Tiere mit einer akuten Pankreatitis (4 mg DBTC/kg KG → **aP**) an Tag 4 transferiert. Diese Tiere (**aP*+LT***) wurden nach zu den o.g. Beobachtungszeitpunkten getötet und das Pankreasgewebe gewonnen. Hieraus wurde dann die Expression von IL-2 auf mRNA-Ebene mittels kompetitiver RT-PCR mit Kontrollfragment (KF) bestimmt, nachdem die einzelnen Proben mittels eines housekeeping-Gens auf die gleiche Ausgangskonzentration eingestellt wurden. 100 % IL-2 entsprechen der Konzentration des KF im jeweiligen Ansatz. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SD aus n unabhängigen Versuchen. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ im Vergleich zum **gesunden Pankreas**; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ im Vergleich zu **0-LT** des jeweiligen Zeitpunkts; † $p < 0,05$, †† $p < 0,01$ im Vergleich zu **aP+LT-0** (nur d21); (Mann-Whitney-Test).

Durch den Lymphozytentransfer nimmt die akute Pankreatitis somit unter dem Aspekt der IL-2-Expression einen ähnlichen Verlauf wie die chronische Pankreatitis.

3.4.3 Interleukin-2-Rezeptor (IL-2-R)

Im **gesunden Pankreas** und auch im Pankreas der Kontroll-Untersuchungen (**0-LT** / **aP+LT-0**) zeigte sich keine Expression von IL-2-R. Dagegen war auf mRNA-Ebene der Tiere nach Transfer (**aP*+LT***) (rote Säulen) eine deutliche Expression zu allen Beobachtungszeitpunkten (Tag 14 / 21 / 28) nachweisbar. Die Mittelwerte der Expression bei einer **cP** waren gleichsinnig erhöht und in etwa 25 % höher als in der Transfergruppe (**aP*+LT***).

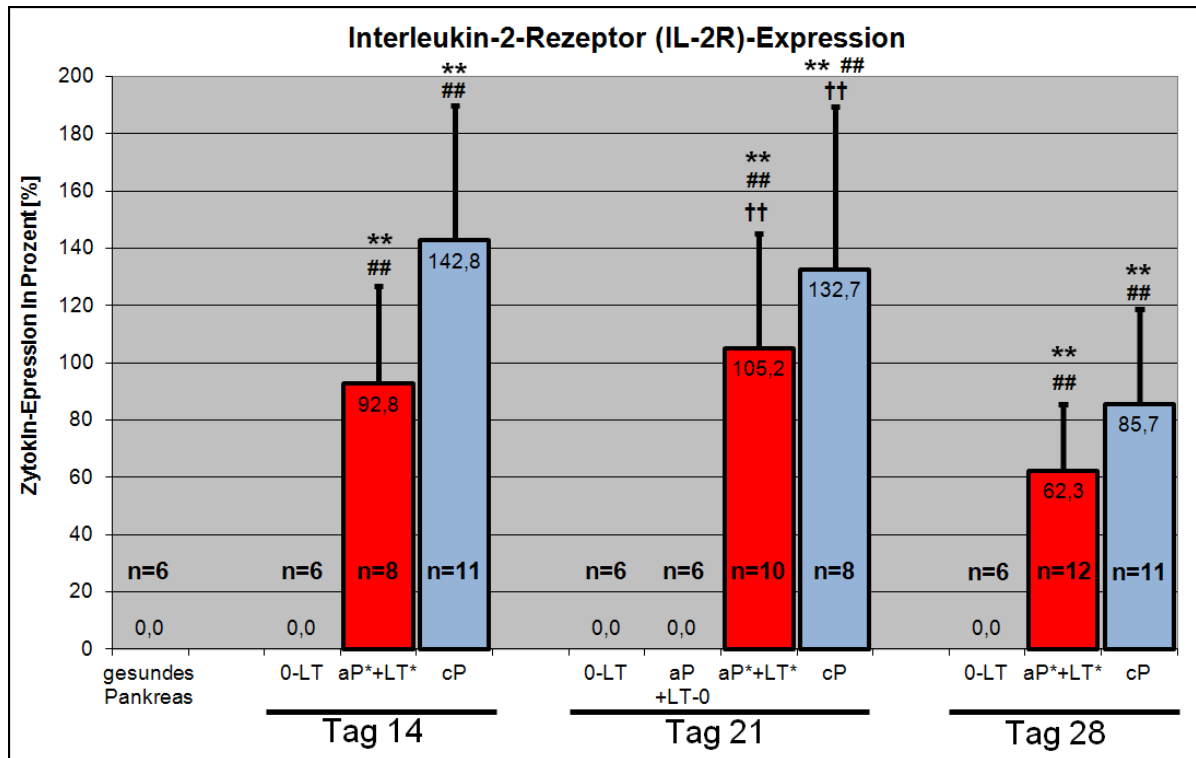


Abb. 31: Übersicht der IL-2-R-Expression

In **gesunden Ratten** wurde durch die intravenöse Gabe einer bestimmten Menge DBTC eine Pankreatitis induziert (4 mg DBTC/kg KG → akute Pankreatitis (**aP**) / 8 mg DBTC/kg KG → chronische Pankreatitis (**cP**)). Aus Tieren mit einer chronischen Pankreatitis wurde nach 28 Tagen mononukleäre Zellen aus Lymphknoten, Milz und peripherem Blut extrahiert und in Tiere mit einer akuten Pankreatitis 4 Tage nach Induktion transferiert. Zu den Zeitpunkten 14, 21 und 28 Tage wurden die Tiere getötet, das Pankreas entnommen und aus dem Gewebe die mRNA extrahiert. Hieraus wurde die Expression von IL-2-R mittels kompetitiver RT-PCR mit einem Kontrollfragment (KF) bestimmt, nachdem einzelnen Proben mittels eines housekeeping-Gens auf die gleiche Ausgangskonzentration eingestellt wurden. 100 % IL-2-R-Expression entspricht der Konzentration des KF in den jeweiligen Proben. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SD aus n unabhängigen Versuchen. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ im Vergleich zum **gesunden Pankreas**; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ im Vergleich zu **0-LT** des jeweiligen Zeitpunkts; † $p < 0,05$, †† $p < 0,01$ im Vergleich zu **aP+LT-0** (nur d21); (Mann-Whitney-Test).

Auch die vermehrte Expression von IL-2-R deutet auf das Vorliegen einer Entzündungsreaktion in der **aP*+LT***-Gruppe vergleichbar mit der einer chronischen Pankreatitis hin.

3.4.4 Interleukin-5 (IL-5)

IL-5 zeigte im **gesunden Pankreas** und in den Kontroll-Gruppen (**0-LT** / **aP+LT-0**) keine Expression (0 %). Dahingegen war auf mRNA-Ebene eine deutliche Expression zu den Beobachtungszeitpunkten Tag 14 / 21 in der Gruppe des Lymphozyten-Transfers (**aP*+LT***) und zu den Tagen 14 / 21 / 28 auch in der **cP** nachweisbar. Die **Abb. 32** fasst die Daten der IL-5-Expression der verschiedenen Gruppen zusammen.

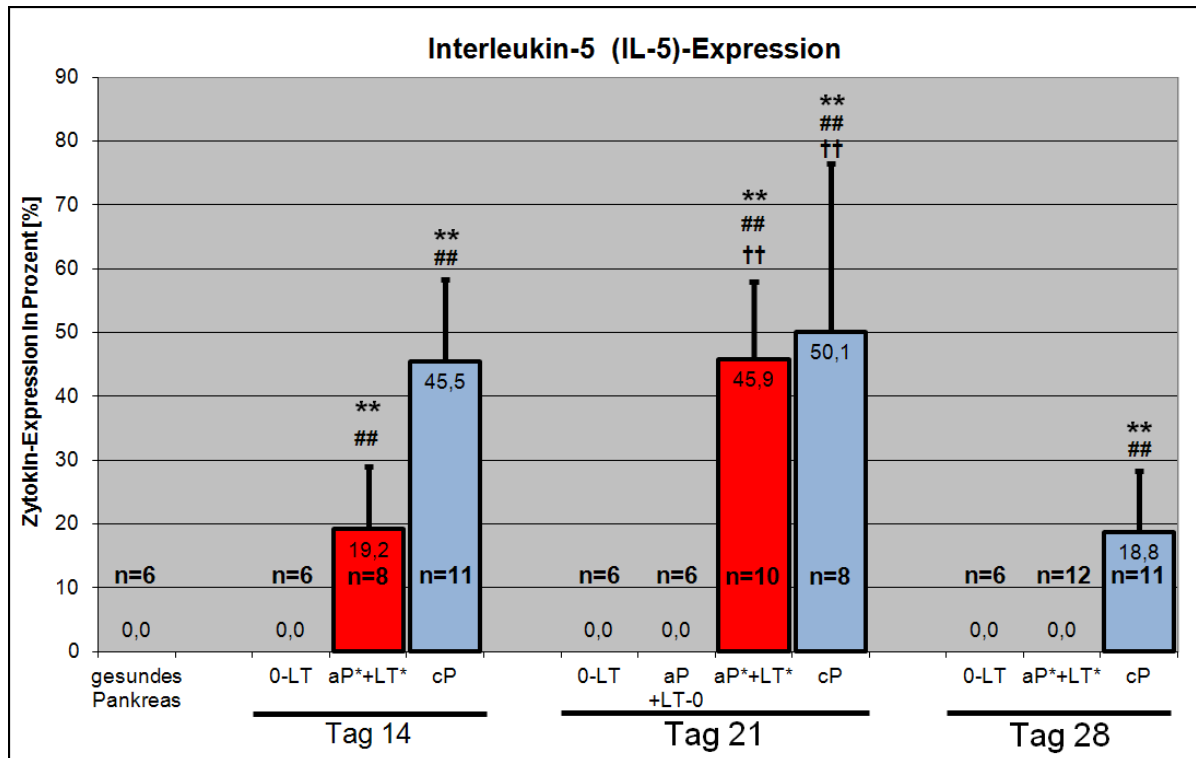


Abb. 32: Übersicht der IL-5-Expression

Durch die intravenöse Gabe einer definierten Menge Dibutyl-Zinn-Dichlorid (DBTC) wurde in gesunden Ratten eine chronische Pankreatitis (8 mg DBTC/kg KG → **cP**) induziert. An Tag 28 nach Induktion wurden von diesen Tieren aus Lymphknoten, Milz und peripherem Blut die mononukleären Zellen extrahiert und auf Tiere mit einer akuten Pankreatitis (4 mg DBTC/kg KG → **aP**) an Tag 4 transferiert. Diese Tiere (**aP*+LT***) wurden nach zu den o.g. Beobachtungszeitpunkten getötet und das Pankreasgewebe gewonnen. Hieraus wurde die Expression von IL-5 auf mRNA-Ebene mittels kompetitiver RT-PCR mit einem Kontrollfragment (KF) bestimmt, nachdem die Proben mittels eines Housekeeping-Gens auf die gleiche Ausgangskonzentration eingestellt wurden. 100 % IL-5-Expression entsprechen der Konzentration des KF in den jeweiligen Proben. Angegeben sind die Mittelwerte +/- SD aus n unabhängigen Versuchen. *p<0,05, **p<0,01 im Vergleich zum **gesunden Pankreas**; #p<0,05, ##p<0,01 im Vergleich zu **0-LT** des jeweiligen Zeitpunkts; †p<0,05, ††p<0,01 im Vergleich zu **aP+LT-0** (nur d21); (Mann-Whitney-Test).

3.4.5 Interleukin-6 (IL-6)

IL-6 war sowohl im **gesunden Pankreas** als auch in den Kontroll-Gruppen (**0-LT** / **aP+LT-0**) nicht nachweisbar. Die Expression von IL-6 auf mRNA-Ebene zeigte in der Transfergruppe (**aP*+LT***) (rote Säulen) und der **cP** ein Maximum an Tag 21. Wie in **Abb. 33** dargestellt, ähnelt der Verlauf der Expression in der Gruppe nach Lymphozyten-Transfer (**aP*+LT***) dem der **cP**, jedoch sind die Mittelwerte der prozentualen Expression im Gewebe der **cP** etwa 50-100 % höher.

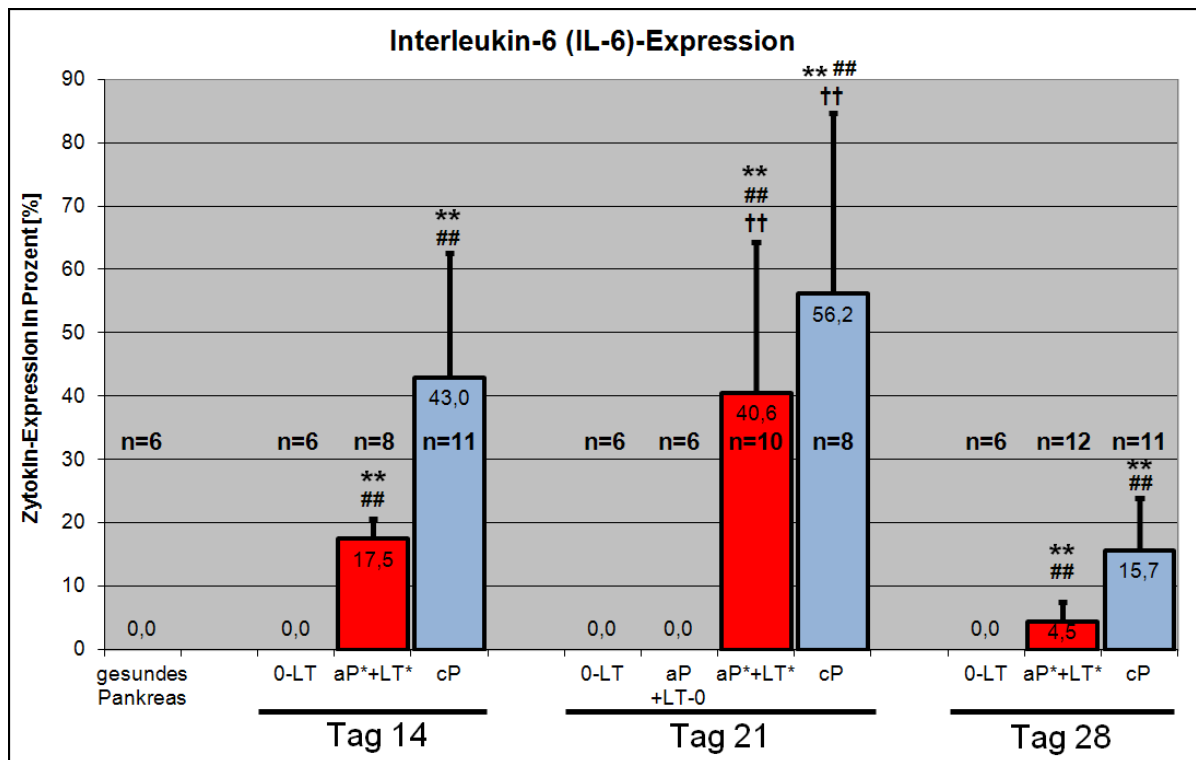


Abb. 33: Übersicht der IL-6-Expression

In **gesunden Ratten** wurde durch die intravenöse Gabe von DBTC eine Pankreatitis induziert (4 mg DBTC/kg KG → akute Pankreatitis (**aP**) / 8 mg DBTC/kg KG → chronische Pankreatitis (**cP**)). Aus Tieren mit einer chronischen Pankreatitis wurde nach 28 Tagen mononukleäre Zellen aus Lymphknoten, Milz und peripherem Blut extrahiert und in Tiere mit einer akuten Pankreatitis 4 Tage nach Induktion transferiert. Zu den Zeitpunkten 14, 21 und 28 Tage wurden die Tiere getötet, das Pankreas entnommen und aus dem Gewebe die mRNA extrahiert. Hieraus wurde die Expression von IL-6 mittels kompetitiver RT-PCR mit einem Kontrollfragment (KF) bestimmt, nachdem die einzelnen Proben mittels eines Housekeeping-Gens auf die gleiche Ausgangskonzentration eingestellt wurden. 100 % IL-6-Expression entspricht der Konzentration des KF in den jeweiligen Proben. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SD aus n unabhängigen Versuchen. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ im Vergleich zum **gesunden Pankreas**; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ im Vergleich zu **0-LT** des jeweiligen Zeitpunkts; † $p < 0,05$, †† $p < 0,01$ im Vergleich zu **aP+LT-0** (nur d21); (Mann-Whitney-Test).

3.4.6 Interleukin-10 (IL-10)

Die IL-10-Expression ist in der Transfergruppe (**aP*+LT***) (rote Säulen) und der **cP** im Vergleich zum gesunden Pankreas deutlich erhöht. Das Maximum der Expression fand sich zum Beobachtungszeitpunkt Tag 21. Die Expression des Zytokins war in der chronischen Pankreatitis-Gruppe ca. 25 % höher als nach Lymphozyten-Transfer. Die **Abb. 34** zeigt eine geringe Expression von IL-10 im **gesunden Pankreas**, in den weiteren Kontrollgruppen (**0-LT** (gesunde Tiere + Lymphozyten aus Ratten mit chronischer Pankreatitis (**cP**) / **aP+LT-0** (akute Pankreatitis + gesunde Lymphozyten)) war zu keinem Zeitpunkt eine IL-10-Expression nachweisbar.

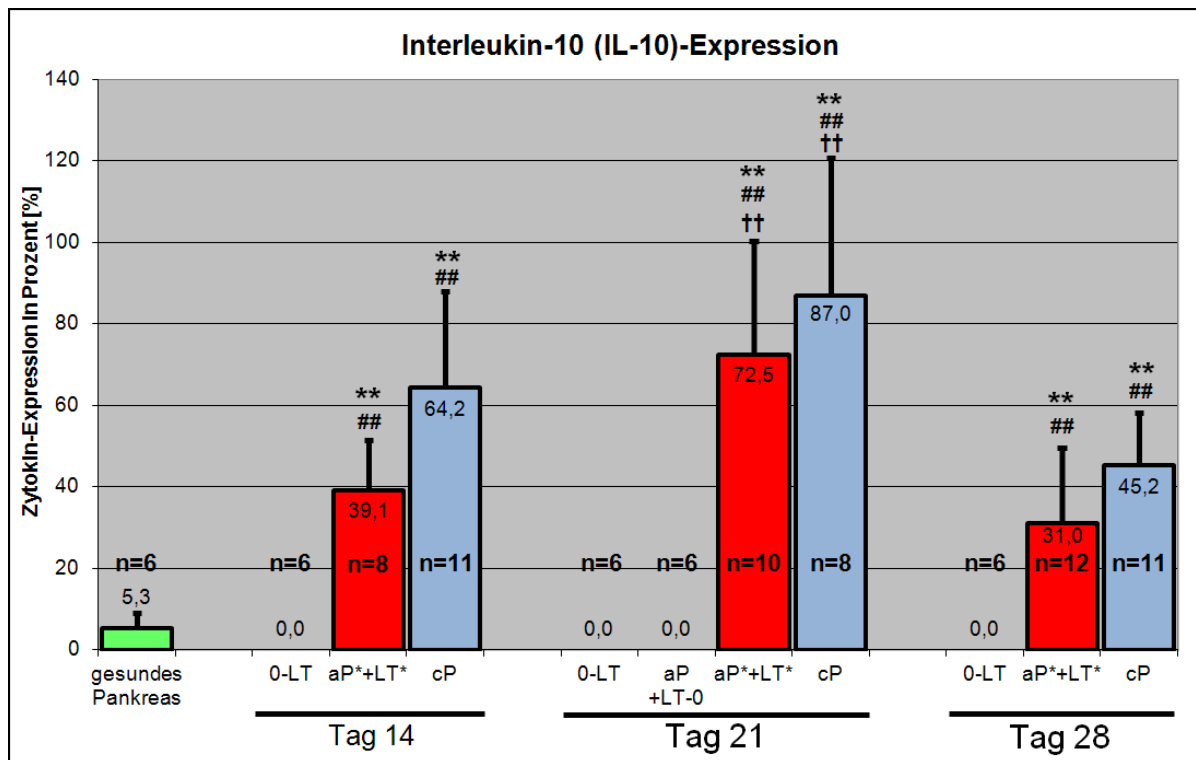


Abb. 34: Übersicht der IL-10-Expression

Durch die intravenöse Gabe einer definierten Menge Dibutyl-Zinn-Dichlorid (DBTC) wurde in gesunden Ratten eine chronische Pankreatitis (8 mg DBTC/kg KG → **cP**) induziert. An Tag 28 nach Induktion wurden von diesen Tieren aus Lymphknoten, Milz und peripherem Blut die mononukleären Zellen extrahiert und auf Tiere mit einer akuten Pankreatitis (4 mg DBTC/kg KG → **aP**) an Tag 4 transferiert. Diese Tiere (**aP*+LT***) wurden nach zu den o.g. Beobachtungszeitpunkten getötet und das Pankreasgewebe gewonnen. Die Expression von IL-10 auf mRNA-Ebene wurde mit einer kompetitiven RT-PCR mit einem Kontrollfragment bestimmt, nachdem die Proben mittels eines Housekeeping-Gens auf die gleiche Ausgangskonzentration eingestellt wurde. 100 % IL-10-Expression entspricht der Konzentration des KF in den jeweiligen Proben. Angegeben sind die Mittelwerte +/- SD aus n unabhängigen Versuchen. *p<0,05, **p<0,01 im Vergleich zum **gesunden Pankreas**; #p<0,05, ##p<0,01 im Vergleich zu **0-LT** des jeweiligen Zeitpunkts; †p<0,05, ††p<0,01 im Vergleich zu **aP+LT-0** (nur d21); (Mann-Whitney-Test).

Durch den Transfer von Lymphozyten aus einer Ratte mit einer chronischen Pankreatitis auf ein Tier mit einer akuten Pankreatitis wird der Verlauf im Sinne eines chronischen Verlaufes verändert, was in einer erhöhten IL-10-Expression Ausdruck findet.

3.4.7 Interleukin 4 (IL-4)

In allen durchgeführten PCR-Untersuchungen zum DBTC-Pankreatitis-Modell konnte keine Expression von IL-4 auf mRNA-Ebene im Pankreasgewebe nachgewiesen werden. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass technische Probleme mit der PCR hierfür den Ausschlag gaben.

Insgesamt sprechen die mRNA-Expressionsanalysen für die Möglichkeit der Übertragung einer Entzündungsreaktion durch den Transfer mononukleärer Zellen auf eine akute Pankreatitis, deren Verlauf deutliche Merkmale einer chronischen Pankreatitis annimmt. Im Gegensatz dazu führt ein Transfer gesunder Lymphozyten auf eine akute Pankreatitis (**aP+LT-0**) oder Lymphozyten von einer Ratte mit einer chronischen Pankreatitis auf ein gesundes Tier (**0-LT**) zu keiner deutlichen Veränderung der Zytokinexpression auf mRNA-Ebene.

3.5 Ergebnisse der Serum-Pankreasenzym-Bestimmung

Ein diagnostischer Laborparameter für eine Pankreasschädigung ist die Erhöhung der Serumwerte von α -Amylase und Lipase. Es ist bekannt, dass im Verlauf der DBTC-induzierten **aP** die Serumspiegel während der 1. Woche leicht ansteigen, danach jedoch abfallen und nach etwa 14 Tagen Normalwerte⁽⁸⁰⁾ erreichen. Versuchsbedingt, erfolgte die Bestimmung der Pankreas-Enzyme im Serum in den hier durchgeführten Untersuchungen jedoch erst zu Tag 14.

3.5.1 Serum-Amylase

Im Serum von **gesunden Tieren** wurde im Mittel ein Wert von 1505,0 U/l bestimmt. Im Vergleich dazu waren in der Lymphozyten-Transfergruppe (**aP*+LT***) (rote Säulen) ca. 200-300 U/l höhere Serumwerte für α -Amylase an den Tagen 14, 21 und 28 des Beobachtungszeitraums nachweisbar. Die Kontroll-Gruppen (**0-LT** / **aP+LT-0**) zeigten α -Amylase-Werte zwischen 1600-1700 U/l. In der **cP** waren die Werte nicht höher als in der Transfergruppe (**aP*+LT***), wie in der **Abb. 35** zusammengefasst.

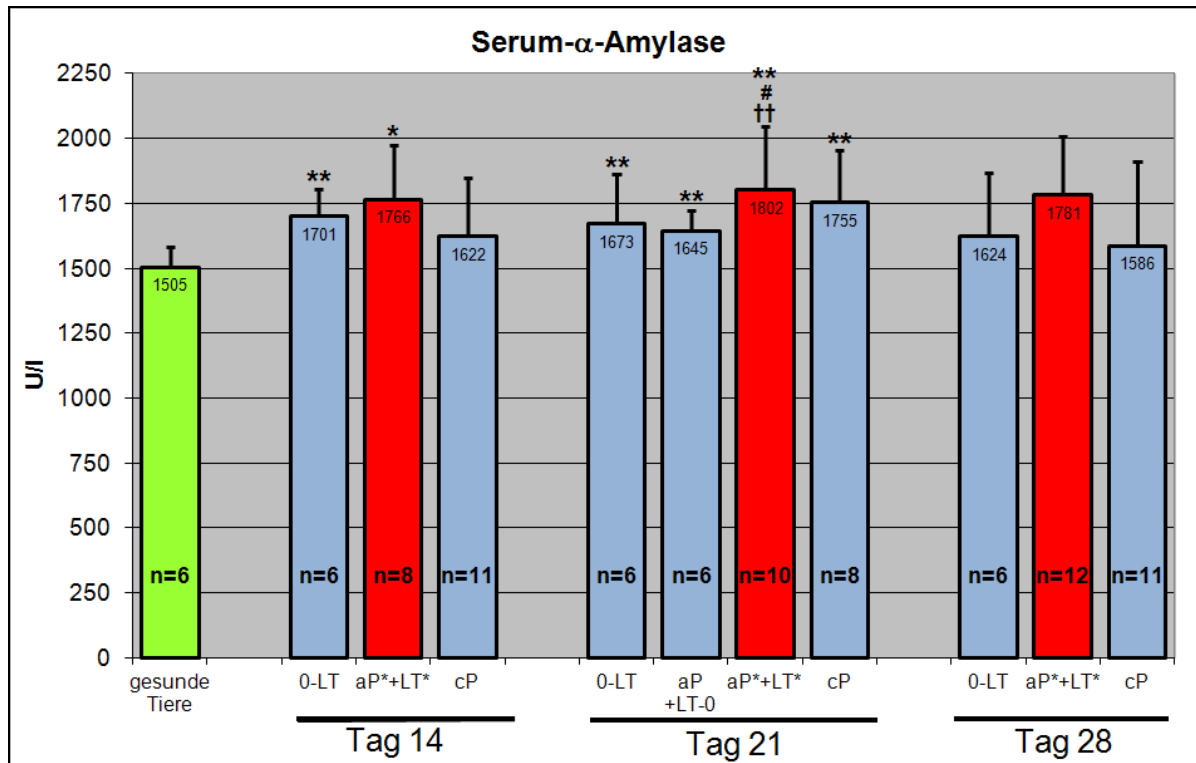


Abb. 35: Übersicht Serum-α-Amylase [U/l]

In **gesunden Ratten** wurde durch die intravenöse Gabe von 4 bzw. 8 mg DBTC/kg KG eine akute Pankreatitis (**aP**) bzw. eine chronische Entzündung (**cP**) induziert. Aus Tieren mit einer **cP** wurden nach 28 Tagen mononukleäre Zellen aus Lymphknoten, Milz und peripherem Blut extrahiert und in Tiere mit einer **aP** 4 Tage nach Induktion transferiert. Zu den Zeitpunkten 14, 21 und 28 Tage wurden die Tiere getötet und das Blut durch direkte Punktion des Herzen gewonnen. Aus dem Serum wurde die α-Amylase bestimmt. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SD aus n unabhängigen Versuchen. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ im Vergleich zum **gesunden Pankreas**; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ im Vergleich zu **0-LT** des jeweiligen Zeitpunkts; † $p < 0,05$, †† $p < 0,01$ im Vergleich zu **aP*+LT-0** (nur d21); (Mann-Whitney-Test).

Erhöhte Amylase-Werte deuten auf eine erhöhte Entzündungsaktivität hin. Zwischen den Gruppen ergeben sich trotz der statistischen Signifikanz absolut gesehen eher nur geringe Unterschiede.

3.5.2 Serum-Lipase

Im Vergleich der einzelnen Gruppen ergab sich eine signifikant höhere Serum-Lipaseaktivität in der Transfergruppe (**aP*+LT***) an den Tagen 14 und 21 im Vergleich zu **gesunden Tieren** und den Kontrollen (**0-LT**), sowie an Tag 21 auch zur Kontrolle **aP+LT-0**. Die Ergebnisse sind in **Abb. 36** zusammengefasst. Die Serum-Lipase normalisierte sich in der **aP*+LT***-Gruppe zu Tag 28, während die cP eine gleichbleibend hohe Lipase-Aktivität zu allen Beobachtungszeitpunkten aufwies.

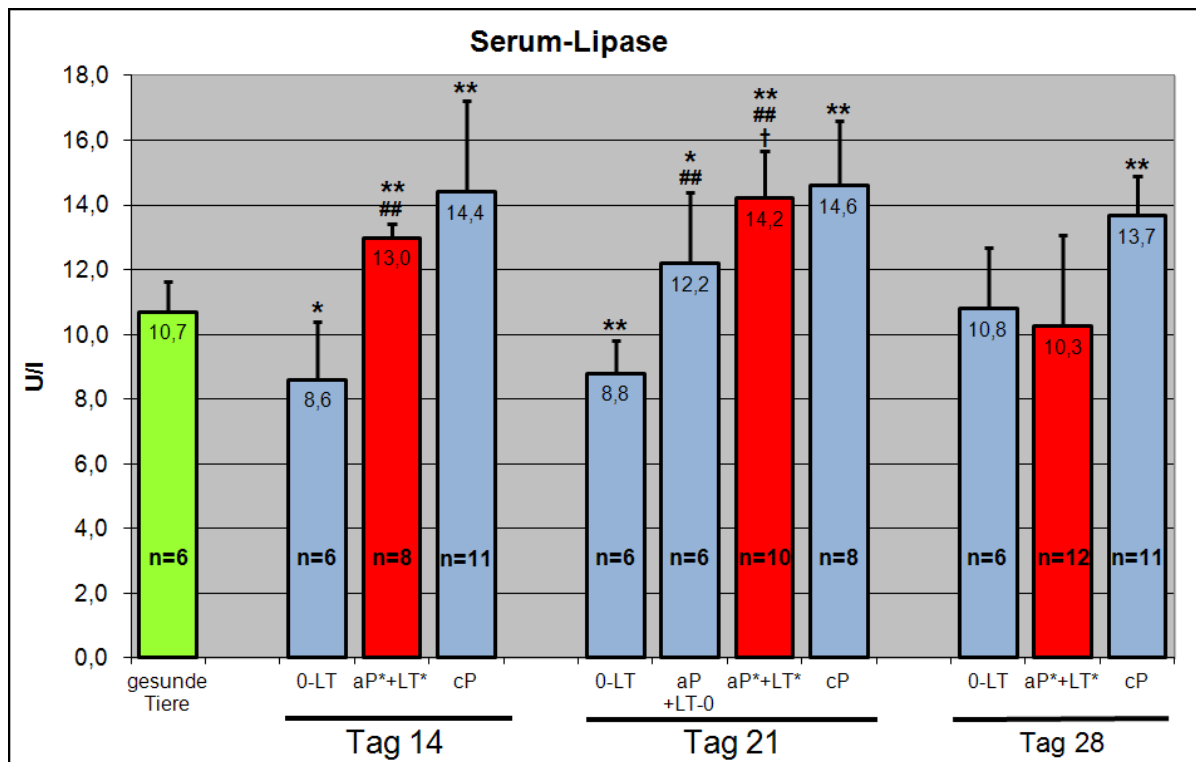


Abb. 36: Übersicht Serum-Lipase [U/l]

Durch die intravenöse Gabe einer definierten Menge Dibutyl-Zinn-Dichlorid (DBTC) wurde in gesunden Ratten eine chronische Pankreatitis (8 mg DBTC/kg KG → **cP**) induziert. An Tag 28 nach Induktion wurden von diesen Tieren aus Lymphknoten, Milz und peripherem Blut die mononukleären Zellen extrahiert und auf Tiere mit einer akuten Pankreatitis (4 mg DBTC/kg KG → **aP**) an Tag 4 transferiert. Diese Tiere (**aP*+LT***) wurden nach zu den o.g. Beobachtungszeitpunkten getötet und durch direkte Herz-Punktion das Blut gewonnen. Hieraus wurde die Aktivität der Lipase bestimmt. Angegeben sind die Mittelwerte +/- SD aus n unabhängigen Versuchen. *p<0,05, **p<0,01 im Vergleich zum **gesunden Pankreas**; #p<0,05, ##p<0,01 im Vergleich zu **0-LT** des jeweiligen Zeitpunkts; †p<0,05, ††p<0,01 im Vergleich zu **aP+LT-0** (nur d21); (Mann-Whitney-Test).

Erhöhte Lipase-Werte deuten auf eine erhöhte Entzündungsaktivität hin. Die erhöhten Werte in der Transfergruppe zu Tag 14 und 21 entsprechen den erhöhten Werten der chronischen Pankreatitis, was auf eine zeitlich verlängerte Entzündungsreaktion in der akuten Pankreatitis hindeutet.

3.6 Ergebnisse der FACS-Analyse

Für die durchflusszytometrischen Untersuchungen wurden die mononukleären Zellen aus dem Blut, den Lymphknoten und der Milz, wie in Kapitel 2 beschrieben, isoliert und anschließend immunzytologisch phänotypisiert. Die aufgrund der Zelloberflächen-Antigene markierten Zellen wurden im FACSscan untersucht. Die durchflusszytometrisch erhobenen Daten werden als Prozentwert aller sich im Leukozytengate befindlichen Zellen angegeben. Die T-Zell-Fraktion der Gesamtleukozyten wurde differenziert in CD4-positive T-Helfer-

Zellen (T_H-Zellen) und CD8-positive zytotoxische T-Zellen bzw. T-Suppressor-Zellen (T_C-Zellen).

3.6.1 Durchflusszytometrie der Blut-Leukozyten (PBMC)

Die durchflusszytometrisch bestimmten Zellpopulationen des peripheren Blutes sind in der unten dargestellten **Tab. 3** als Mittelwerte mit den jeweils berechneten Standardabweichungen (SD) angegeben.

Blut-Lymphozyten (PBMC)					
	CD4⁺ [%]	CD8⁺ [%]	$\frac{CD4^+}{CD8^+}$	CD45⁺-RA [%]	IL-2-Rez. [%]
gesunde Tiere	60,9 ± 2,6 n = 6	21,1 ± 0,7 n = 6	2,8 ± 0,1 n = 6	4,8 ± 3,0 n = 6	5,3 ± 0,8 n = 6
14 Tage 0-LT	47,2 ± 4,9 n = 6	22,4 ± 3,3 n = 6	2,1 ± 0,3 n = 6	13,5 ± 1,9 n = 6	4,2 ± 0,8 n = 6
aP*+LT*	46,8 ± 6,7 n = 8	19,4 ± 4,1 n = 8	2,5 ± 0,3 n = 8	15,2 ± 4,2 n = 8	3,2 ± 1,3 n = 8
cP	49,5 ± 9,7 n = 11	21,6 ± 5,3 n = 11	1,5 ± 0,7 n = 11	15,3 ± 5,1 n = 11	3,9 ± 1,6 n = 11
21 Tage 0-LT	46,7 ± 5,4 n = 6	22,9 ± 3,0 n = 6	2,0 ± 0,1 n = 6	14,1 ± 2,7 n = 6	4,4 ± 0,8 n = 6
aP+LT-0	42,2 ± 7,6 n = 6	21,4 ± 1,9 n = 6	2,0 ± 0,4 n = 6	11,2 ± 4,1 n = 6	5,6 ± 0,6 n = 6
aP*+LT*	40,2 ± 13,9 n = 10	25,9 ± 10,3 n = 10	1,7 ± 1,0 n = 10	17,0 ± 9,4 n = 10	4,2 ± 0,4 n = 10
cP	51,9 ± 7,4 n = 8	22,9 ± 2,9 n = 8	2,3 ± 0,5 n = 8	14,7 ± 7,1 n = 8	4,8 ± 0,8 n = 8
28 Tage 0-LT	47,0 ± 5,3 n = 6	22,6 ± 4,2 n = 6	2,1 ± 0,2 n = 6	14,1 ± 2,7 n = 6	3,7 ± 0,6 n = 6
aP*+LT*	45,7 ± 2,5 n = 12	23,1 ± 2,0 n = 12	2,0 ± 0,2 n = 12	14,1 ± 2,1 n = 12	3,8 ± 0,7 n = 12
cP	44,7 ± 9,8 n = 11	20,1 ± 4,3 n = 11	2,2 ± 0,2 n = 11	17,6 ± 3,8 n = 11	3,4 ± 1,5 n = 11

Tab. 3: Übersicht der Mittelwerte FACS-Analyse (PBMC) (MW ± SD)

Durch die intravenöse Gabe von 8 mg DBTC/kg KG wurde in gesunden Ratten eine **cP** induziert. An Tag 28 nach Induktion wurden von diesen Tieren aus Lymphknoten, Milz und peripherem Blut die mononukleären Zellen extrahiert und auf Tiere mit einer akuten Pankreatitis (4 mg DBTC/kg KG → **aP**) an Tag 4 transferiert. Diese Tiere (**aP*+LT***) wurden nach zu den o.g. Beobachtungszeitpunkten getötet und durch direkte Herz-Punktion das Blut gewonnen. Hieraus wurden die mononukleären Zellen extrahiert, mit spezifischen Antikörpern markiert und im FACSscan analysiert. Angegeben sind die Mittelwerte +/- SD aus n unabhängigen Versuchen. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. *p<0,05 (Mann-Whitney-Test).

Auf systemischer Ebene ergaben sich nur minimale Veränderungen der einzelnen Zell-Population. Ein signifikanter Unterschied ließ sich nicht nachweisen.

3.6.2 Durchflusszytometrie der Lymphknoten-Leukozyten (LNC)

Die Mittelwerte der durchflusszytometrischen Bestimmung der aus den Lymphknoten gewonnenen LNC sind in **Tab. 4** mit den jeweils berechneten Standardabweichungen (SD) angegeben. Der statistische Vergleich der einzelnen Gruppen ergab keinen signifikanten Unterschied.

Lymphknoten-Lymphozyten (LNC)						
		CD4 ⁺ [%]	CD8 ⁺ [%]	$\frac{CD4^+}{CD8^+}$	CD45 ⁺ -RA [%]	IL-2-Rez. [%]
gesunde Tiere		54,9 ± 8,2 n = 6	24,7 ± 15,0 n = 6	2,9 ± 1,6 n = 6	16,0 ± 10,9 n = 6	7,1 ± 2,1 n = 6
14 Tage	0-LT	54,4 ± 4,4 n = 6	26,3 ± 7,1 n = 6	2,2 ± 0,4 n = 6	17,1 ± 2,3 n = 6	6,2 ± 0,7 n = 6
	aP*+LT*	50,6 ± 0,4 n = 8	22,8 ± 3,2 n = 8	2,3 ± 0,3 n = 8	15,8 ± 3,2 n = 8	5,4 ± 1,1 n = 8
	cP	58,0 ± 9,5 n = 11	21,9 ± 1,9 n = 11	2,6 ± 0,3 n = 11	19,9 ± 3,6 n = 11	6,0 ± 1,7 n = 11
21 Tage	0-LT	45,2 ± 14,8 n = 6	23,6 ± 6,9 n = 6	2,0 ± 0,9 n = 6	17,4 ± 2,3 n = 6	6,2 ± 1,9 n = 6
	aP+LT-0	54,9 ± 6,3 n = 6	24,7 ± 12,9 n = 6	2,9 ± 1,3 n = 6	16,0 ± 8,7 n = 6	7,1 ± 1,9 n = 6
	aP*+LT*	52,5 ± 10,6 n = 10	25,9 ± 2,3 n = 10	1,8 ± 0,2 n = 10	19,0 ± 11,8 n = 10	5,0 ± 0,4 n = 10
	cP	51,3 ± 4,1 n = 8	23,1 ± 2,7 n = 8	2,2 ± 0,2 n = 8	11,9 ± 4,2 n = 8	5,3 ± 1,0 n = 8
28 Tage	0-LT	49,1 ± 4,5 n = 6	19,0 v 4,3 n = 6	2,7 ± 0,4 n = 6	22,3 ± 3,4 n = 6	5,5 ± 1,2 n = 6
	aP*+LT*	54,5 ± 2,5 n = 12	25,2 ± 4,7 n = 12	2,2 ± 0,4 n = 12	21,8 ± 6,2 n = 12	6,3 ± 0,6 n = 12
	cP	47,7 ± 2,7 n = 11	20,1 ± 1,8 n = 11	2,4 ± 0,2 n = 11	24,2 ± 7,8 n = 11	5,6 ± 0,4 n = 11

Tab. 4: Übersicht der Mittelwerte FACS-Analyse (LNC) (MW ± SD)

Durch die intravenöse Gabe einer definierten Menge Dibutyl-Zinn-Dichlorid (DBTC) wurde in gesunden Ratten eine chronische Pankreatitis (8 mg DBTC/kg KG → **cP**) induziert. An Tag 28 nach Induktion wurden von diesen Tieren aus Lymphknoten, Milz und peripherem Blut die mononukleären Zellen extrahiert und auf Tiere mit einer akuten Pankreatitis (4 mg DBTC/kg KG → **aP**) an Tag 4 transferiert. Diese Tiere (**aP*+LT***) wurden nach zu den o.g. Beobachtungszeitpunkten getötet und die Lymphknoten extrahiert. Hieraus wurden die mononukleären Zellen extrahiert und mit spezifischen Antikörpern markiert und im FACScan analysiert. Angegeben sind die Mittelwerte +/- SD aus n unabhängigen Versuchen. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. *p<0,05 (Mann-Whitney-Test).

3.6.3 Durchflusszytometrie der Milz-Leukozyten (SMC)

Die Mittelwerte der durchflusszytometrisch bestimmten Zellpopulationen SMC sind in der unten dargestellten **Tab. 5** mit den jeweils berechneten Standardabweichungen (SD) angegeben. Die Auswertung der in der Milz nachweisbaren Zell-Populationen ergab nur minimale Veränderungen, die sich statistisch als nicht signifikant herausstellten.

Milz-Lymphozyten (SMC)						
		CD4 ⁺ [%]	CD8 ⁺ [%]	$\frac{CD4^+}{CD8^+}$	CD45 ⁺ -RA [%]	IL-2-Rez. [%]
gesunde Tiere		44,0 ± 3,3 n = 6	31,7 ± 5,4 n = 6	1,4 ± 0,1 n = 6	36,1 ± 0,6 n = 6	6,7 ± 0,1 n = 6
14 Tage	0-LT	46,2 ± 3,1 n = 6	27,4 ± 4,3 n = 6	1,7 ± 0,2 n = 6	21,5 ± 3,1 n = 6	6,9 ± 2,3 n = 6
	aP*+LT*	44,0 ± 2,2 n = 8	24,9 ± 11,6 n = 8	2,1 ± 1,0 n = 8	31,4 ± 3,1 n = 8	8,9 ± 1,9 n = 8
	cP	37,3 ± 2,8 n = 11	28,3 ± 1,7 n = 11	1,3 ± 0,2 n = 11	26,0 ± 10,3 n = 11	6,5 ± 1,6 n = 11
21 Tage	0-LT	43,3 ± 5,5 n = 6	32,2 ± 3,6 n = 6	1,4 ± 0,2 n = 6	24,9 ± 3,5 n = 6	6,5 ± 1,1 n = 6
	aP+LT-0	43,2 ± 2,9 n = 6	34,0 ± 4,5 n = 6	1,3 ± 0,2 n = 6	38,5 ± 3,0 n = 6	6,0 ± 0,9 n = 6
	aP*+LT*	51,8 ± 8,3 n = 10	36,2 ± 7,2 n = 10	1,5 ± 0,3 n = 10	31,6 ± 14,3 n = 10	8,5 ± 3,4 n = 10
	cP	38,8 ± 7,5 n = 8	26,8 ± 5,5 n = 8	1,5 ± 0,5 n = 8	24,5 ± 5,5 n = 8	5,7 ± 0,5 n = 8
28 Tage	0-LT	44,6 ± 3,9 n = 6	26,5 ± 8,1 n = 6	1,9 ± 0,8 n = 6	26,0 ± 4,4 n = 6	6,8 ± 0,8 n = 6
	aP*+LT*	45,5 ± 2,5 n = 12	33,1 ± 3,9 n = 12	1,4 ± 0,2 n = 12	36,7 ± 8,2 n = 12	8,8 ± 2,4 n = 12
	cP	39,4 ± 5,7 n = 11	28,3 ± 9,3 n = 11	1,6 ± 0,6 n = 11	41,3 ± 4,9 n = 11	5,4 ± 0,9 n = 11

Tab. 5: Übersicht der Mittelwerte FACS-Analyse (SMC) (MW ± SD).

Durch die intravenöse Gabe einer definierten Menge Dibutyl-Zinn-Dichlorid (DBTC) wurde in gesunden Ratten eine chronische Pankreatitis (8 mg DBTC/kg KG → **cP**) induziert. An Tag 28 nach Induktion wurden von diesen Tieren aus Lymphknoten, Milz und peripherem Blut die mononukleären Zellen extrahiert und auf Tiere mit einer akuten Pankreatitis (4 mg DBTC/kg KG → **aP**) an Tag 4 transferiert. Diese Tiere (**aP*+LT***) wurden nach zu den o.g. Beobachtungszeitpunkten getötet und die Milz entnommen. Hieraus wurden die mononukleären Zellen extrahiert und mit spezifischen Antikörpern markiert und im FACScan analysiert. Angegeben sind die Mittelwerte +/- SD aus n unabhängigen Versuchen. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. *p<0,05 (Mann-Whitney-Test).

4 Diskussion

Die Pathogenese der chronischen Pankreatitis ist, mit Ausnahme der hereditären Pankreatitis, nicht genau bekannt ^(9/22/84/85). Es wurden mehrere Hypothesen, hauptsächlich zur Pathogenese der alkoholischen Pankreatitis, vorgeschlagen ^(96/97/99/100). Eine zentrale Rolle spielt insbesondere der Entwicklungs-Schritt, der durch die Fibrose-Ausbildung von der akuten Pankreatitis zu einer chronischen Pankreatitis führt ⁽⁸⁸⁾. Diese Nekrose-Fibrose-Sequenz beschreibt die pathogenetische Entwicklung der chronischen Pankreatitis über wiederholte akute Pankreatitiden. Hier bilden sich durch Autodigestion Nekrosen von Azinuszellen, die eine Infiltration mit Lymphozyten, Makrophagen und Fibroblasten bewirken ^(88/99). Der zunächst nur lokale, perilobuläre Prozess führt im Verlauf durch zunehmende Fibrose zu einer Verengung und konsekutiver proximaler Dilatation der interlobulären Gänge und konsekutiver Pankreasgangdilatation. Durch die Gangstauung wird auch die Gefäßversorgung des Pankreasparenchyms beeinträchtigt und hierdurch zusätzlich Azinuszellen zerstört. In der Folge kommt es zu den klassischen fibrotischen Veränderungen der cP, die sich klinisch in einer exokrinen und endokrinen Insuffizienz manifestiert ^(88/99). Zusätzlich tritt jedoch eine ausgeprägte Aktivierung des Immunsystems in diesem Gewebe auf, die erkennbar wird durch eine erhöhte Leukozyten-Infiltration ⁽⁹³⁾ im Interstitium und konsekutiv erhöhte Werte entzündungsfördernder Zytokine im Pankreas-Gewebe ^(79/81/94). Aufgrund dieser Tatsache liegt die Annahme nahe, dass bei der Entwicklung einer chronischen Pankreatitis immunologische Mechanismen, v.a. der zellulären Zytotoxizität (Lymphozyten / Makrophagen ^(99/105/118)), bei der Bildung und Ablagerung von Kollagenen und anderen Komponenten der extrazellulären Matrix (EZM) beteiligt sind. Beispielsweise können Entzündungszellen entzündliche Mediatoren (v.a. Zytokine) produzieren, die die Proliferation der Fibroblasten und den Stoffwechsel der EZM erhöhen ⁽²⁰⁾.

Hauptsächlich wird ein chronischer Alkoholabusus (75 %) als Ursache für die chronische Pankreatitis verantwortlich gemacht ⁽¹²³⁾. Darüber hinaus wurden weitere pathogenetische Faktoren definiert. Hierzu zählen u.a. obstruktive Pankreasgangveränderungen (u.a. langsam wachsende Tumoren, Pankreas divisum), Gendefekte (u.a. CFTR-, SPINK1-Mutationen) und metabolische Ursachen (u.a. Hyperlipidämie, Hyperkalzämie). Außerdem wurde in den letzten Jahren das Konzept einer Autoimmunpankreatitis (AIP) als eigenständige Entität etabliert ^(121/122), die eine Sonderform der cP darstellt. Diese Form ist charakterisiert durch eine Hypergammaglobulinämie und eine gute therapeutische Beeinflussbarkeit durch Steroide. Aufgrund einer schwierigen Abgrenzbarkeit zum

Pankreaskarzinom sollte die differenzialdiagnostische Abklärung nur interdisziplinär in einem geeigneten Zentrum erfolgen.

4.1 Grundlagen

Menschliches Pankreasgewebe ist meist bei Diagnosestellung einer chronischen Pankreatitis schon fortgeschritten verändert, und auch OP-Präparate sind nur in begrenzter Anzahl vorhanden. Zusätzlich ist es aus ethischen Gründen nicht vertretbar, aus Forschungszwecken Pankreaspunktionen durchzuführen. Zudem ist hierdurch nur eine Momentaufnahme zu erfassen, die dennoch aber häufig eine deutliche Aktivierung des Immunsystems im Organ aufzeigt. Für eine Verlaufsbeschreibung der Entwicklung einer chronischen Pankreatitis wurden deshalb zahlreiche Tiermodelle etabliert ^(67/70/72/74/76/78/80). Von diesen Modellen erfüllt v.a. das Modell der DBTC-Pankreatitis die histologischen Kriterien einer chronischen Pankreatitis. Die lokalen Veränderungen sind mit der Situation im menschlichen Organ vergleichbar. Hierzu zählen sowohl eine Infiltration mit Leukozyten als auch eine zunehmende Organdestruktion mit Entwicklung einer progredienten Fibrose. Diese Fibrose führt zu einer Dilatation des Ductus pancreaticus durch Obstruktion mit Zelldetritus und einer Stase des Pankreassekretes ⁽¹⁰⁶⁾. Letztendlich beruht die Wirkung des DBTC primär auf einem toxischen Effekt. Erst sekundär kommt es zu einer Aktivierung des Immunsystems mit einer v.a. T-Zell-vermittelten Immunantwort, die die Wirkung der auslösenden chemischen Substanz (DBTC) zeitlich deutlich überdauert. Darüber hinaus ist die DBTC-Pankreatitis der Ratte das einzige Tiermodell, bei dem sowohl eine akute Pankreasschädigung als auch eine chronische Pankreatitis induziert werden können ^(80/89). Das DBTC-Pankreatitis-Modell bietet damit eine gute Möglichkeit, die Pathogenese der chronischen Pankreatitis zu untersuchen. Die genauere Charakterisierung dieses Modells ⁽⁸¹⁾ und auch weitere Hinweise in der Literatur lassen auf die Beteiligung immunologischer Mechanismen, v.a. spezifisch aktivierter, autoreaktiver T-Lymphozyten, bei der Entstehung einer chronischen Pankreatitis schließen.

4.2 Hypothese: Übertragbarkeit der chronischen DBTC-Pankreatitis durch Transfer von Lymphozyten

Bezüglich der Genese der chronischen Pankreasschädigung wird eine immunologische Komponente angenommen. Die akute toxische Schädigung von Organstrukturen bei einem akuten Pankreatitis-Schub führt zu einer Freisetzung von intra- und extrazellulären Proteinen im extrem enzymreichen Pankreasgewebe, gefolgt von einem unspezifischen

Leukozyten-Recruitment aus dem Blutkreislauf. Die im Organ daraufhin v.a. Zytokin-vermittelt stattfindende inflammatorische Reaktion ^(89/107) schließt auch Phagozytose, Antigen-Processing und Antigen-Präsentation via major histocompatibility complex (MHC)-Moleküle ein. Normalerweise werden körpereigene Moleküle nicht als Antigen erkannt, dennoch ist unter den lokalen Gegebenheiten im geschädigten Pankreasgewebe eine Störung der verschiedenen Schritte denkbar ⁽⁸⁶⁾. Es wird vermutet, dass die durch verschiedene Antigene sensibilisierten Lymphozyten einen chronischen Entzündungsprozeß unterhalten ⁽¹⁰⁷⁾. Die erhöhte Anzahl aktivierter inflammatorischer Zellen ist neben einer erhöhten Proliferation auch auf eine gleichzeitig reduzierte Apoptose dieser Zellen zurückzuführen ⁽⁹⁵⁾.

Die Hypothese einer möglichen Übertragbarkeit dieser Entzündungsreaktion führte zu den in der vorliegenden Arbeit dargestellten Versuchen um den Transfer mononukleärer Zellen. Hierzu wurden Lymphozyten von Ratten mit einer chronischen DBTC-Pankreatitis aus Blut, Milz und Lymphknoten extrahiert und auf Tiere mit einer akuten DBTC-Pankreatitis transferiert. Anschließend wurde der Verlauf der akuten DBTC-Pankreatitis dahingehend untersucht, ob Veränderungen durch die vermutete Übertragung des Entzündungsprozesses hervorgerufen werden konnten.

4.3 DBTC-Tiermodell und Lymphozyten-Transfer

Das DBTC-Pankreatitismodell an Ratten wurde in vorhergehenden Untersuchungen zunächst genau charakterisiert. Die akute, ödematöse DBTC-Pankreatitis (i.v.-Injektion von 4 mg DBTC/kg KG → aP ⁽⁸⁰⁾) und die chronisch verlaufende Schädigung des Pankreas, hervorgerufen durch i.v.-Injektion von 8 mg DBTC/kg KG → cP ⁽⁸¹⁾, wurden in ihren Verläufen bezüglich histologischen Organveränderungen, Zellinfiltration und Zytokin-Expression definiert. Die Veränderungen im DBTC-Modell sind primär ausgelöst durch eine toxische Wirkung der Substanz. Erst sekundär kommt es zu einer Aktivierung des Immunsystems und zu histopathologischen Veränderungen, die der cP beim Menschen sehr ähnlich sind ⁽⁸²⁾. Diese Voruntersuchungen dienten als Vergleichsgrundlage für den Transfer von mononukleären Zellen und o.g. DBTC-Pankreatitis-Modell. Dabei ist die Entzündungsreaktion der hier beschriebenen cP abzugrenzen von der eigenständigen Entität der Autoimmunpankreatitis (AIP). Das DBTC-Modell der akuten und chronischen Pankreatitis beschreibt explizit die immunologischen Mechanismen als Folge der toxischen Wirkung einer definierten Menge einer Substanz (DBTC) auf das Pankreasgewebe von Ratten.

Aus Tieren mit einer chronischen DBTC-Pankreatitis wurden an Tag 28 die mononukleären aus Blut, Lymphknoten und Milz extrahiert und auf Tiere mit einer akuten DBTC-Pankreatitis an Tag 4 transferiert. Anschließend wurden die Tiere an den Tagen 14, 21 und 28 getötet und auf Veränderungen untersucht. Als Kontrolluntersuchung wurden zum einen gesunde Lymphozyten auf Ratten mit einer akuten DBTC-Pankreatitis transferiert und zum anderen Lymphozyten einer chronischen DBTC-Pankreatitis auf gesunde Tiere übertragen. Anschließend wurde mit den Tieren entsprechend den eigentlichen Transferversuchen vorgegangen. In der Gruppe mit Transfer von cP-Lymphozyten auf aP-Ratten (**aP*+LT***) konnten deutliche Veränderungen auf makroskopischer, mikroskopischer, zellulärer und molekularer Ebene zum Verlauf der akuten DBTC-Pankreatitis beobachtet werden, die in den nachfolgenden Abschnitten im Detail diskutiert werden:

4.4 Veränderungen durch den Lymphozyten-Transfer

Das Tiermodell der DBTC-Pankreatitis in Ratten beruht primär auf den toxischen Effekt der intravenös applizierten Substanz DBTC. Durch die einmalige Gabe kommt es dosisabhängig zu einer entweder nur blanden, akuten Pankreatitis (4 mg DBTC/kg KG) ohne persistierende Organveränderungen, oder andererseits zu einer chronischen Pankreatitis (8 mg DBTC/kg KG) mit weitreichendem Umbau der Organstruktur. Die umfangreichen Voruntersuchungen zu diesem Pankreatitis-Modell ergaben neben den akuten und chronischen Veränderungen auch eine Aktivierung immunologischer Mechanismen ^(80/81), die sich u. a. in einer vermehrten Infiltration mit immunkompetenten Zellen und der Expression von Interleukinen zeigte.

Die vermutete immunologische Komponente bildete den Ausgangspunkt der Versuche im Rahmen dieser Arbeit. Durch den Transfer immunkompetenter Zellen, die aus Ratten mit einer makroskopisch nachweisbaren chronischen Pankreatitis extrahiert wurden, konnte der Verlauf der vorher genau beschriebenen akuten DBTC-Pankreatitis (4 mg DBTC/kg KG) im Sinne eines chronischen Verlaufes verändert werden.

Die Chronifizierung der akuten Entzündungsreaktion fand makroskopisch ihren Ausdruck in einer Dilatation des Pankreasgangsystems. In der Gruppe der Transfertierte mit akuter DBTC-Pankreatitis wurde zu den Beobachtungszeitpunkten Tag 14 und 21 zu einem hohen Prozentsatz eine Pankreasgangstauung festgestellt. Da eine Erweiterung des Gangsystems u.a. durch eine ausgeprägte periduktales Entzündungsreaktion ⁽⁸⁸⁾ hervorgerufen wird, ist dies ein klarer Hinweis auf eine deutlich stärkere Schädigung des

Pankreas, zumal eine derartige Dilatation in allen Vorversuchen zur akuten DBTC-Pankreatitis nicht aufgetreten war ⁽⁸⁰⁾.

Die Chronifizierung der akuten DBTC-Pankreatitis durch den Lymphozytentransfer konnte ebenfalls auch in der histologischen Aufarbeitung der Organe nachgewiesen werden. Es zeigte sich eine v. a. periduktal ausgeprägte Destruktion von exokrinem Pankreasgewebe mit Ausbildung tubulärer Komplexe (gangähnlichen Strukturen, die durch Transdifferenzierung von Azinuszellen entstehen). Ein weiteres Merkmal dieses Entzündungsprozesses war auch die starke Zunahme des periduktalen Bindegewebes.

Wenn nun in diesen Gewebsschnitten die inflammatorischen Zellen angefärbt wurden, ergaben sich durch den Lymphozytentransfer ebenfalls deutlich erhöhte Werte in diesen v.a. in der Nähe des Gangsystems gelegenen Arealen. Die v.a. zu Beginn vorherrschende Zellpopulation sind die CD4⁺-T-Zellen. Somit ist dieser Zelltyp an der Aufrechterhaltung der inflammatorischen Reaktion sehr stark beteiligt ^(86/93). Diese erfolgt einerseits durch eine Ko-Stimulation der Makrophagen-Aktivierung via Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine (v.a. IFN- γ und IL-2) im Sinne einer Th1-Antwort und andererseits durch einen direkten zytotoxischen Effekt ⁽⁹⁰⁾. Diese Beobachtung wird unterstützt durch Daten, die eine Beeinflussbarkeit der Erkrankungs-Ausprägung durch anti-CD4-Antikörper-Administration belegen, ^(90/91) wohingegen eine CD8⁺-T-Zell-Depletion den Verlauf der Erkrankung nicht zu beeinflussen vermag. Zusätzlich zeigte sich in den eigenen Untersuchungen eine Persistenz der CD4⁺-T-Zellinfiltration, die sich deutlich in der Anzahl der nachweisbaren Zellen und der Dauer der Infiltration vom Verlauf der akuten DBTC-Pankreatitis unterscheidet. Hier waren meist nach 14 Tagen kaum noch Entzündungszellinfiltrate nachweisbar.

Nach ca. 21 Tagen kommt es bei der chronischen DBTC-Pankreatitis zu einem Shift der vorherrschenden Zellentität. Die CD8⁺-T-Zellen nehmen deutlich zu und sind die bestimmende Zellart im fortgeschrittenen Verlauf der cP ⁽⁸¹⁾. Ähnliche Veränderungen im Infiltrationsmuster wurden in den eigenen Untersuchungen durch den Transfer von Lymphozyten auf Ratten mit akuter DBTC-Pankreatitis ausgelöst.

Eine erhöhte Lymphozyteninfiltration führt letztlich auch zu einer vermehrten Zytokinexpression im Pankreasgewebe. Die gesteigerte Expression von Interleukin-2-Rezeptor-mRNA (IL-2-R) zeigt eine vermehrte Aktivierung von T-Lymphozyten an. Darüber hinaus sind auch die als lymphozyten-spezifisch bekannten Zytokine Interferon- γ (IFN- γ) und Interleukin-2 (IL-2) von Interesse. Diese waren erhöht bei der cP nachweisbar, sind aber auch nach erfolgtem Transfer im Pankreasgewebe vorhanden. Diese pro-

inflammatorischen Zytokine (IL-2 / IFN- γ) sind ein eindeutiger Hinweis für eine verstärkte Entzündungsreaktion, die in diesem Ausmaß bei der akuten DBTC-Pankreatitis nicht nachgewiesen werden konnte.

Die makroskopischen, histologischen und molekularen Veränderungen durch den Transfer von Lymphozyten spiegeln sich nicht in einer deutlichen Veränderung der Serum-Werte für Amylase und Lipase wider. Es ließen sich zwar signifikante Unterschiede berechnen, jedoch ist daraus kein Hinweis auf eine erhöhte Entzündungsaktivität abzuleiten. In den Voruntersuchungen zur akuten- und chronischen-DBTC-Pankreatitis waren deutliche Veränderungen nur innerhalb der ersten 7 Tage, zum Zeitpunkt der akuten Schädigung, nachweisbar ⁽⁸⁹⁾. Methodisch bedingt, wurden in dieser Studie erst ab Tag 14 Messwerte erhoben. Wahrscheinlich war es zu diesem Zeitpunkt bereits weitgehend wieder zu einem Abfall der Amylase- und Lipasewerte in den Normbereich gekommen.

Eine genauere Betrachtung der aus Blut, Lymphknoten und Milz gewonnenen Zell-Populationen zeigte nur minimale Unterschiede zwischen den Tieren mit und ohne Lymphozytentransfer. Dies steht im starken Gegensatz zur gleichzeitig im Pankreasgewebe stattfindenden Zellinfiltration nach Übertragung der Lymphozyten. Es lässt sich eine antigen-vermittelte, organ-spezifische Migration und/oder lokal erhöhte Persistenz immunkompetenter Zellen im Pankreasgewebe vermuten, die nicht zu Verschiebungen der Zell-Populationen in anderen Organsystemen führt. Somit besteht nur ein lokal begrenzter Effekt.

Die hervorgerufenen Veränderungen haben insgesamt ein Ausprägungs-Maximum um den 21. Tag nach Pankreatitis-Induktion (= 17 Tage nach Transfer mononukleärer Zellen). Danach kommt es nachweisbar zu einem langsamen Rückgang der Entzündungsreaktion (Zellinfiltration / Expression inflammatorischer Zytokine) und der makroskopischen Gangstauung. Daraus kann man schließen, dass es sich bei der autoimmunologischen Reaktion zunächst nur um einen temporär begrenzten Effekt handelt. In Folgeuntersuchungen sollte überprüft werden, ob durch einen zweiten Transfer Antigen-spezifisch aktivierter Lymphozyten (z. B. an Tag 28 nach Pankreatitis-Induktion) die Entzündungsreaktion wieder verstärkt werden kann.

Die makroskopischen Veränderungen (Pankreasgangstauung), die erhöhte Zellinfiltration und die deutlich gesteigerte Expression proinflammatorischer Zytokine sind die grundlegenden Veränderungen des Verlaufes der akuten DBTC-Pankreatitis. Durch den Transfer der mononukleären Zellen von Ratten mit einer chronischen DBTC-Pankreatitis

wird somit der Entzündungsprozess im Pankreasgewebe dahingehend verstärkt und unterhalten, dass eine Chronifizierung die Folge ist. Speziell wird auf die Rolle einzelner Zellen / Zytokine im folgenden Abschnitt eingegangen:

4.5 CD4⁺- und CD8⁺-T-Lymphozyten

Die Untersuchungen von Gewebeproben von Patienten mit äthyltoxischer cP zeigen eine erhöhte Zahl von CD4⁺- und CD8⁺-T-Lymphozyten ⁽¹¹⁸⁾. Gerade zu Beginn des Entzündungsprozesses, der letztlich zu einer chronischen Pankreatitis führt, ergibt sich eine Dominanz der CD4⁺-Untergruppe, die ihre Wirkung auf v.a. zwei unterschiedlichen Wegen vermittelt. Einerseits erfolgt eine Costimulation der Makrophagen-Aktivierung via Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine, andererseits besteht ein direkter zytotoxischer Effekt ⁽⁹⁰⁾. Diese Beobachtung wird unterstützt durch experimentelle Daten der Pankreatitis-Tiermodelle mit Cerulein und DBTC, die eine Besserung des Krankheitsverlaufs nach Blockade der Immunantwort durch anti-CD4⁺-Antikörper-Gabe zeigen ^(90/91). Dahingegen vermag eine Depletion der CD8⁺-T-Zellen den Verlauf einer cP nicht zu beeinflussen ⁽⁹⁰⁾. Diese CD8⁺-T-Lymphozyten sind aber die vorherrschende Zell-Population im späteren Verlauf der Erkrankung ^(81/86/93). Ein abnehmender CD4/CD8-Quotient verdeutlicht diese Veränderung bei der chronischen DBTC-Pankreatitis. Die Daten sind vergleichbar mit den Ergebnissen von untersuchten menschlichen OP-Präparaten ^(118/124), die ebenfalls eine Dominanz der CD8⁺-T-Lymphozyten in terminal geschädigten Organen zeigen ⁽⁹³⁾. Während die CD4⁺-Zellen die entscheidende Rolle zu Beginn der Entzündungsreaktion spielen, scheinen CD8⁺-T-Zellen einen großen Teil zur Gewebe-Destruktion bei der chronischen alkoholischen Pankreatitis beizutragen ⁽⁹³⁾.

Das beschriebene Muster der Infiltration mit CD4⁺- und CD8⁺-Lymphozyten ist sowohl bei der cP als auch nach Transfer der Lymphozyten in der akuten DBTC-Pankreatitis nachweisbar. Dies unterstützt die Hypothese, dass immunologische Mechanismen in der Genese der chronischen Pankreatitis eine wesentliche Rolle spielen. Zudem ist es offensichtlich möglich, allein durch den Transfer aktivierter immunkompetenter Zellen diese chronische Entzündungsreaktion auf nur gering vorgeschädigte Tiere zu übertragen.

4.6 IFN-γ und IL-2

Die Zytokine IFN-γ und IL-2 gehören zu den proinflammatorischen Botenstoffen. Sie stammen v.a. von CD4⁺-T-Zellen ⁽⁹⁴⁾ ab und können durch spezifische Stimulation eine Entzündungsreaktion aufrechterhalten. Beide Zytokine werden dem Th1-Sekretionsprofil

zugeordnet (=“Th1-Typ-Zytokine“), was einer überwiegend zellulär-vermittelten Immunantwort entspricht, wobei es zu einer Aktivierung von Makrophagen kommt. Im Gegensatz dazu resultiert eine Th2-Antwort in einer v.a. durch die Zytokine IL-4 und IL-10 resultierenden Differenzierung von B-Lymphozyten zu Plasmazellen, und bewirkt somit eine antikörpervermittelte Reaktion. IFN- γ fördert v.a. die Th1-Differenzierung und hemmt gleichzeitig die Proliferation der Th2-Zellen ⁽¹²⁵⁾. Die Verschiebung des Th1/Th2-Gleichgewichtes zugunsten des Th1-Profiles wird auch im Gewebe menschlicher chronischer Pankreatitiden nachgewiesen ⁽⁹³⁾. Zusätzlich ist IFN- γ neben IL-2 auch an der Differenzierung von zytotoxischen T-Zellen beteiligt ⁽¹²⁶⁾. Diese Zell-Population ist auch an der Organdestruktion bei der chronischen Pankreatitis beteiligt ⁽⁹³⁾. Die erhöhte Expression von IFN- γ in der chronischen Pankreatitis und auch in der akuten DBTC-Pankreatitis mit Lymphozytentransfer, sowie das Fehlen im gesunden Pankreasgewebe lassen auf die Existenz einer autoreaktiven, zytotoxischen Entzündungsreaktion schließen.

IL-2 stimuliert relativ unspezifisch die T-Zellen und wird selbst in einem antigenabhängigen Prozess gebildet ⁽¹²⁷⁾. Die Antigenerkennung ist ein wichtiger Schritt im Rahmen der Immunantwort. Somit spricht die erhöhte Expression von IL-2-mRNA für das Vorliegen einer Antigen-vermittelten Entzündungsreaktion.

Die aktivierten T-Zellen differenzieren sich unter dem Einfluss dieser Zytokine zu zytotoxischen T-Lymphozyten und sind an der Organzerstörung bei der chronischen Pankreatitis beteiligt ⁽⁹³⁾ (siehe **Abb. 37: PHASE 2**). Der erhöhte Nachweis der Zytokine IFN- γ , IL-2 und IL-6 im Gewebe der cP ⁽⁸¹⁾ und auch im Pankreas der Ratten nach Lymphozytentransfer (**aP*+LT***) unterstreicht das Vorliegen einer autoreaktiven, zytotoxischen Entzündungsreaktion, die durch den Transfer übertragen wurde (siehe **Abb. 37: TRANSFER VON PHASE 2**). Diese Hypothese wird noch verstärkt durch das Fehlen von IFN- γ - und IL-2-RNA im Normalgewebe und im Gewebe von Ratten mit einer akuten DBTC-Pankreatitis nach Tag 14.

4.7 Kontroll-Untersuchungen zum Lymphozyten-Transfer

Aufgrund der immunhistochemisch v.a. periduktal nachweisbaren Zellinfiltration lässt sich vermuten, dass die Pankreasgangzellen selbst Träger der Antigene sind ⁽⁵⁸⁾, weswegen es primär zu einer periduktalen Entzündungsreaktion kommt. Eine Förderung der Entzündung geht sicherlich auch von der erhöhten Produktion proinflammatorischer Zytokine aus. Die nachfolgende Ausbreitung der Entzündungsreaktion führt letztendlich zu einer

zunehmenden Zerstörung von Azinuszellen und ihrem Ersatz durch fibrotisches Bindegewebe. Die erhobenen Daten sprechen somit für eine Beteiligung autoreaktiver, zytotoxischer Zellen bei der DBTC-Pankreatitis, die durch eine fehlgesteuerte Antigen-Prozessierung in der akuten Schädigung des Organs ihren Ursprung nimmt ⁽⁹³⁾. Jedoch können die als autoreaktiv zu bezeichnenden Immunzellen nicht in jeder Situation eine Organschädigung nach Transfer bewirken. So zeigten die Kontroll-Tiere ohne induzierte akute Pankreatitis (**0-LT**) nach Transfer von mononukleären Zellen aus Tieren mit einer chronischen DBTC-Pankreatitis (8 mg DBTC/kg KG) keine spezifischen Veränderungen im Pankreas. Diese Beobachtung veranschaulicht die Notwendigkeit einer geringen Vorschädigung des Organs, die hier durch eine akute DBTC-Pankreatitis (4 mg DBTC/kg KG) erfolgte. Jedoch ist eine Vorschädigung in Kombination mit einem Transfer von Lymphozyten aus gesunden Ratten (**aP+LT-0**) nicht ausreichend, eine stärkere lokale Reaktion im Pankreas zu erzeugen, als es die alleinige Gabe von 4 mg DBTC/kg KG zur Folge hat. Wie aus anderen Modellen bekannt ist, treten Autoimmunreaktionen vor allem im Zusammenhang mit unspezifischen Entzündungen auf.

4.8 Ausblick

Wenn es gelingt, die Rolle der Lymphozyten genauer zu erforschen, sollte es möglich sein, den Verlauf chronischer Erkrankungen besser und möglichst frühzeitig zu beeinflussen. Je früher eine verlässliche Diagnose gestellt werden kann, desto besser können Folgeschäden und Organdestruktion durch den Entzündungsprozess vermieden werden. Die in der Genese der chronischen Pankreatitis nach einer primär toxischen Schädigung (siehe **Abb. 37: PHASE 1**) vermuteten autoreaktiven zytotoxischen-T-Lymphozyten sind durch die fehlerhafte Erkennung eines körpereigenen Antigens aktiviert worden. Es haben damit regulierende Mechanismen der körpereigenen Immunität versagt, diese T-Zellen zu eliminieren. Dieser Prozess könnte somit Ausdruck eines autoimmunen Pathomechanismus (siehe **Abb. 37: PHASE 2**) sein ⁽¹²⁸⁾, ist aber als chronische Pankreatitis formal nicht einer Autoimmunerkrankung zuzuordnen. Gerade auf dem Gebiet der Autoimmunerkrankungen hat es in den letzten Jahren umfangreiche neue Erkenntnisse gegeben. So wurde das bekannte Th1/Th2-Konzept um weitere Reaktionsmuster erweitert, die nach dem dominierenden Zytokin benannt sind. Bezüglich der Genese von Autoimmunerkrankungen scheint v.a. die Th17-Antwort mit Bildung von Interleukin-17 (IL-17) eine große Rolle zu spielen ⁽¹²⁹⁾. Durch IL-17 wird eine effiziente Th1-Antwort unterdrückt und dadurch der Entzündungsprozeß chronifiziert. Zu den typischen Zytokinen

gehört u.a. Interleukin-6 (IL-6), welches in den Zielzellen von IL-17 gebildet wird. Hierzu zählen B- und T-Lymphozyten, Fibroblasten, Epithel- und Endothelzellen.

Zusätzlich wurde die Rolle regulatorischer T-Lymphozyten in den letzten Jahren deutlich besser herausgearbeitet. Sie sind neben den typischen Oberflächen-Antigenen auch positiv für CD25 und verhindern z.B. einen Überschuss an Th1-vermittelter Immunantwort. Eine Dysbalance im Th1-/Th2-Verhältnis kann einen chronischen Entzündungszustand und damit auch eine Autoimmunerkrankung begünstigen. Demnach ist auch eine Fehlfunktion regulatorischer T-Lymphozyten eine mögliche Ursache chronischer Entzündungen. Hier ist im Vergleich zur immunologischen Reaktion bei der cP keine primär toxische Schädigung als Ursache der Erkrankung auszumachen. Dies ist damit ein deutlicher Unterschied der autoimmunen Pankreatitis (AIP) im Vergleich zur chronischen DBTC-Pankreatitis und der akuten Pankreatitis mit Lymphozyten-Transfer.

In der Pankreatologie wurde entsprechend den neuen Erkenntnissen die Autoimmunerkrankung als eigenständiges Krankheitsbild etabliert. Die Inzidenz dieser Verlaufsform ist jedoch sehr gering. Wichtig ist deshalb, dass auch Untersuchungen zur „typischen“ chronischen Pankreatitis deutliche Hinweise für eine Beteiligung immunologischer Mechanismen u.a. an der fortschreitenden Destruktion der Organstruktur ergaben. Autoimmune Prozesse sind damit möglicherweise auch bei den häufigeren Verlaufsformen der CP zumindest partiell an der Aufrechterhaltung der Entzündungsreaktion beteiligt. Es müssen jedoch weitere Untersuchungen erfolgen, um dieses Konzept genauer aufzuarbeiten und zu belegen. Langfristig könnten auf diese Weise auch neue Therapiestrategien entwickelt werden, die auf eine Verhinderung der Chronifizierung des Entzündungsverlaufs durch eine Modulation der Immunantwort abzielen.

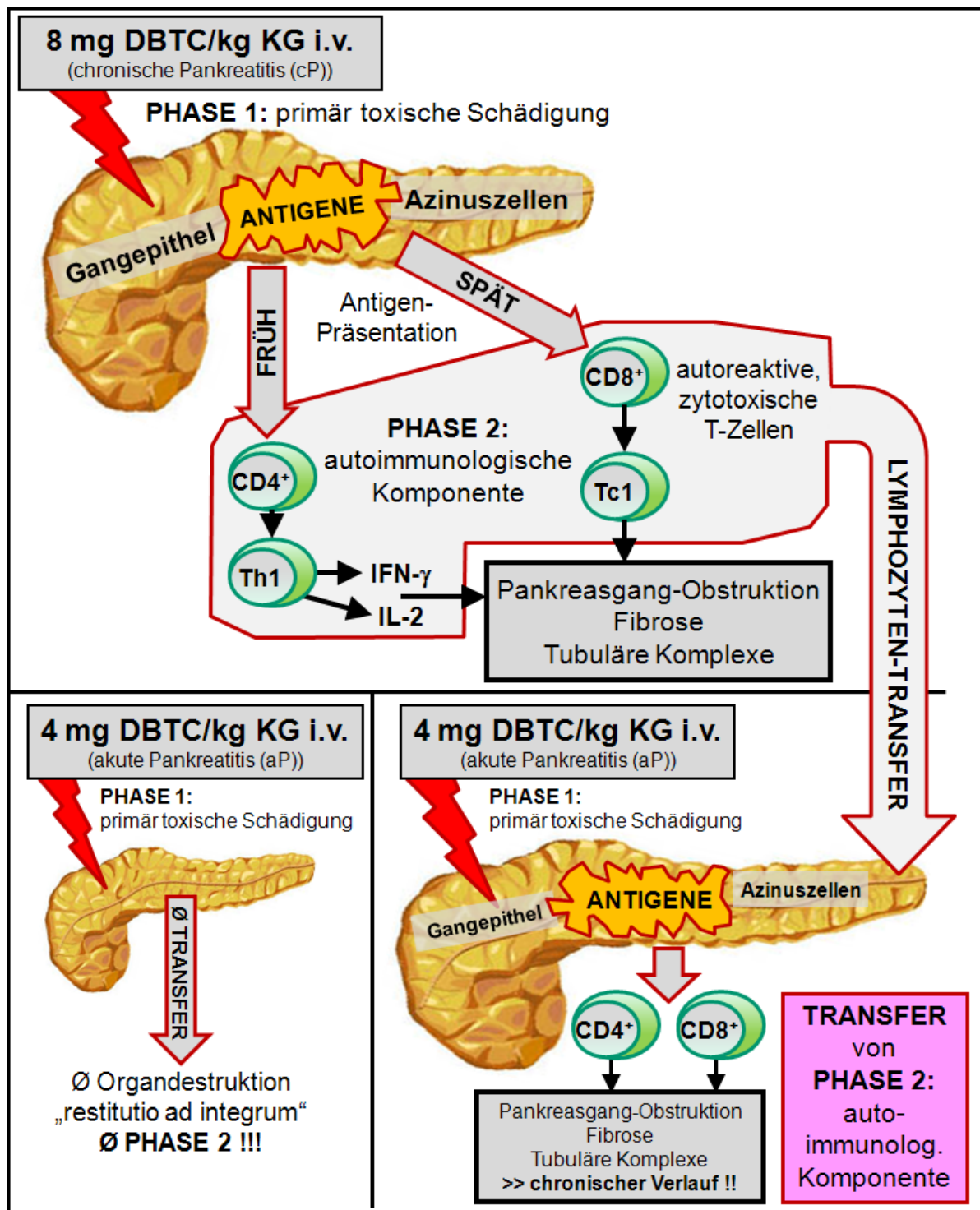


Abb. 37: Schema des Lymphozyten-Transfers

Durch 8 mg DBTC/kg KG wurde in Ratten eine chronische Pankreatitis (cP) ausgelöst. An Tag 28 wurden aus Blut / Milz und Lymphknoten die Lymphozyten extrahiert und anschließend auf Ratten mit einer akuten Pankreatitis (4 mg DBTC/kg KG) an Tag 4 transferiert. Anschließend wurden an den Tagen 14, 21 und 28 die Tiere getötet und die Veränderungen im Vergleich zum normalen Verlauf der akuten DBTC-Pankreatitis evaluiert. Es zeigt sich eine deutliche chronische Schädigung des Pankreas nach Lymphozyten-Transfer, die durch eine Übertragung der autoimmunologischen Komponente (**TRANSFER von PHASE 2**) hervorgerufen wird.

5 Zusammenfassung

Die pathogenetischen Mechanismen, die zu einer chronischen Pankreatitis führen, sind sehr komplex und bis heute nicht vollständig bekannt. Da menschliche Gewebe nicht in einer ausreichenden Anzahl verfügbar sind, wurden zahlreiche Tiermodelle zum Studium der Genese etabliert. Mit dem detailliert charakterisierten Dibutylzinn-Dichlorid (DBTC)-Tiermodell an Ratten kann dosisabhängig entweder eine akute Pankreatitis (4 mg DBTC/kg KG) mit vollständiger Ausheilung ohne Organveränderungen oder eine chronische Pankreatitis (8 mg DBTC/kg KG) hervorgerufen werden. Diese geht nach primär toxischer Wirkung des DBTC einher mit einer makroskopisch sichtbaren Pankreasgangdilatation, mikroskopisch umfangreichen und persistierenden Veränderungen der Organstruktur, deutlich erhöhter Infiltration mit immunkompetenten Zellen und einer erhöhten Zytokinexpression. Vergleichbar sind diese Veränderungen mit den Merkmalen der menschlichen chronischen Pankreatitis.

Da sich Hinweise auf eine Aktivierung des Immunsystems in der Genese der chronischen Pankreatitis ergeben, wird eine immunologische Komponente vermutet, die zu einer deutlich verstärkten Schädigung des Organs beiträgt. In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob es möglich ist, durch einen Transfer von mononukleären Zellen von Tieren mit einer chronischen Pankreatitis auf Ratten mit einer akuten Pankreatitis (**aP*+LT***) den Verlauf der akuten Erkrankung im Sinne eines chronischen Verlaufes zu beeinflussen. Dieser Transfer würde die Rolle autoreaktiver T-Zellen in der Pathophysiologie der chronischen Pankreatitis belegen. Die Lymphozyten zum Transfer wurden aus peripherem Blut, Lymphknoten und Milz der chronisch geschädigten Tiere gewonnen. Als Kontroll-Untersuchungen wurden zum einen Lymphozyten aus gesunden Tieren auf Ratten mit einer akuten DBTC-Pankreatitis (**aP+LT-0**) transferiert und zum anderen Lymphozyten von Ratten mit einer chronischen Pankreatitis auf gesunde Ratten (**0-LT**) übertragen.

Die Tiere wurden 14, 21 und 28 Tage nach Transfer getötet und die Organe entnommen. Die Effekte, hervorgerufen durch den Transfer, wurden anschließend makroskopisch, mikroskopisch (Fibrose / Zellinfiltration) und auf mRNA-Ebene (Interleukine) mit dem vorher detailliert charakterisierten Verläufen der akuten und der chronischen DBTC-Pankreatitis verglichen. Es wurden folgende Veränderungen herausgearbeitet:

Der auffälligste Unterschied zur aP zeigte sich in einer vermehrt nachweisbaren Pankreasgangstauung, welche im normalen Verlauf der akuten DBTC-Pankreatitis nicht aufgetreten war. Die Stauung ist eine makroskopisch sichtbare Folge des Transfers. Es

konnte die in der chronischen Pankreatitis v.a. periduktal stattfindende Entzündungsreaktion mit der Folge einer Pankreasgangverengung durch die Übertragung der Lymphozyten auch in der sonst blande verlaufenden aP induziert werden.

Die makroskopischen Beobachtungen waren auch auf histologischer Ebene nachvollziehbar. Den Pankreasgangstenosen entsprach eine v.a. periduktal ausgeprägte Entzündungsreaktion mit vermehrter Bildung von Bindegewebe. Diese Fibrose ging einher mit einer Schädigung und Atrophie von Azinuszellen.

Zusätzlich spiegelt sich dieser periduktale Prozess auch in einer erhöhten Infiltration mit immunkompetenten Zellen wider. Hier dominierte zu Beginn des Entzündungsprozesses die CD4⁺-T-Zell-Population, der eine zentrale Rolle in der Initiierung der inflammatorischen Reaktion zukommt. Nach spezifischer Aktivierung in Gewebe der cP und Transfer in ein Tier mit nur gering vorgeschädigtem Organ sind diese Zellen in der Lage, eine persistierende Entzündungsreaktion hervorrufen. Im weiteren Verlauf veränderte sich die dominierende T-Zell-Population zugunsten der CD8⁺-T-Lymphozyten. Diese Zellen bewirken eine Persistenz der Entzündungsreaktion und tragen zu einem daraufhin folgenden fibrotischen Umbau des Organs bei. Diese Veränderung der dominierenden Zellpopulation ist auch in den menschlichen Pankreata mit chronischer Pankreatitis nachweisbar.

Weiterhin wurden nach dem Transfer von mononukleären Zellen aus Tieren mit einer chronischen Pankreatitis auf Ratten mit einer akuten Pankreatitis erhöhte Werte der proinflammatorischen Zytokine IL-2 und IFN- γ beobachtet, die ebenfalls auf einen verstärkt ablaufenden Entzündungsprozess hinweisen. Bei der akuten DBTC-Pankreatitis war eine so ausgeprägte Entzündungsreaktion nach Tag 14 nicht nachweisbar. Ein vergleichbares Zytokinmuster liegt auch bei der chronischen Pankreatitis vor und deutet auf eine Immunreaktion vom Th1-Typ hin. Der Nachweis von IL-2 spricht für auf einen antigenabhängigen Prozess, der durch den Lymphozytentransfer übertragen wurde. Es ist offensichtlich möglich, durch den Transfer aktivierter immunkompetenter Zellen eine chronische Entzündungsreaktion auf nur gering vorgeschädigte Tiere zu übertragen.

Es wird vermutet, dass es im Rahmen einer chronischen Pankreatitis durch ein fehlgesteuertes Antigen-Processing zu einer Aktivierung und Reaktion von Lymphozyten gegen körpereigene Strukturen kommt. Eine geringe Vorschädigung des Organes und der Transfer dieser immunkompetenten Zellen führt dann zur chemotaktisch vermittelten Infiltration der antigen-spezifisch aktivierten Lymphozyten, was schließlich eine Schädigung des Organs im Sinne einer chronischen Entzündungsreaktion bewirkt. Dieser Vorgang ist

abzugrenzen von der eigentlichen Autoimmunpankreatitis, wo es ebenfalls zu einer Reaktion des Immunsystems gegen körpereigene Strukturen kommt. Bei dieser Entität ist keine Vorschädigung des Organs zu erheben, während bei der hier untersuchten DBTC-Pankreatitis die immunologische Reaktion auf eine primär toxische Organschädigung folgt.

Die Ergebnisse der Arbeit zeigen die Möglichkeit der Modulation des Verlaufes einer akuten Pankreatitis durch die Übertragung von immunkompetenten und spezifisch aktivierten Zellen. Diese T-Zellen haben nach Aktivierung im chronisch entzündeten Gewebe eine autoreaktive Wirkung gegen körpereigene Strukturen. Nur durch die Übertragung dieser Zellen ist jedoch keine spezifische Pankreasschädigung auszulösen, wie die Kontroll-Untersuchungen (**0-LT**), bei denen aktivierte Lymphozyten auf gesunde Tiere transferiert wurden, belegen. Es scheint eine geringe Vorschädigung des Pankreasgewebes für die Entwicklung einer chronischen Entzündungsreaktion notwendig zu sein.

Die zunehmende Kenntnis der genetischen und pathophysiologisch-immunologischen Grundlagen chronischer Pankreaserkrankungen wird in Zukunft neben einer besseren Diagnostik auch zu einer verbesserten Therapie führen. Ein deutlicher Fortschritt wäre schon eine frühzeitigere Diagnose und dadurch die Möglichkeit zur Verhinderung chronischer Organ-Veränderungen.

6 Thesen

These 1:

Die Grundlagen der chronischen Pankreatitis (CP) sind bisher nicht vollständig aufgeklärt. Vor dem Hintergrund einer begrenzten Verfügbarkeit menschlichen Probenmaterials bieten experimentelle Tiermodelle eine wichtige Möglichkeit, pathogenetische Mechanismen zu studieren.

These 2:

Die Dibutylzinndichlorid (DBTC)-induzierte Pankreatitis der Ratte eignet sich sowohl zum Studium akuter als auch chronischer Entzündungsprozesse des Organs, weil über die DBTC-Dosis eine Steuerung des Entzündungsverlaufs möglich ist. Vier mg DBTC/kg Körpergewicht lösen eine akute, mild verlaufende Entzündung aus, während acht mg/kg zu einem schweren, chronischen Krankheitsverlauf führen.

These 3:

Der vorliegenden Arbeit lag die Hypothese zugrunde, dass die Chronifizierung der DBTC-Pankreatitis nicht nur auf toxischen Wirkungen der Substanz beruht, sondern auch eine immunologische Komponente hat. Konkret sollte geprüft werden, ob allein durch den Transfer von Lymphozyten, isoliert aus Blut, Lymphknoten und Milz chronisch erkrankter Tiere, auf Ratten mit einer akuten DBTC-Pankreatitis eine chronische CP induziert werden kann.

These 4:

Die akute DBTC-Pankreatitis und die chronische DBTC-Pankreatitis wurden bezüglich makroskopischer Erscheinung, histologischen Veränderungen, Zellinfiltration, Zytokinexpression und Serumenzymen charakterisiert und dienten als Vergleichsgrundlage für die durch den Lymphozytentransfer hervorgerufenen Veränderungen.

These 5:

Durch den Lymphozyten-Transfer konnte eine makroskopisch sichtbare Pankreasgangdilatation hervorgerufen werden, die in allen vorherigen Untersuchungen zur akuten DBTC-Pankreatitis nicht aufgetreten war.

These 6:

Der Transfer von Lymphozyten aus Ratten mit einer chronischen DBTC-Pankreatitis auf Tiere mit einer akuten Entzündung verändert das histologische Erscheinungsbild der Erkrankung: Es wird vermehrt periduktales Bindegewebe gebildet, und es kommt zur Ausbildung tubulärer Komplexe. Insgesamt gleichen sich die histologischen Befunde deutlich denen bei der cP an.

These 7:

Die Infiltration mit CD4⁺-T-Lymphozyten ist v.a. zu Beginn nach Induktion einer akuten Pankreatitis und Lymphozytentransfer von Tieren mit einer chronischen DBTC-Pankreatitis signifikant erhöht. CD4⁺-T-Zellen spielen eine entscheidende Rolle v.a. zu Beginn des Entzündungsprozesses.

These 8:

CD8⁺-T-Lymphozyten sind die bestimmende Zell-Population im späteren Verlauf des Entzündungsprozesses nach Lymphozytentransfer von Ratten mit einer chronischen DBTC-Pankreatitis auf Tiere mit einer akuten DBTC-Pankreatitis. Das Muster der Zellinfiltration mit CD8⁺-T-Zellen ähnelt damit dem der chronischen DBTC-Pankreatitis und unterstreicht die vermutete immunologische Genese.

These 9:

Eine zu Beginn erhöhte CD4⁺-Infiltration und im weiteren Verlauf vorherrschende CD8⁺-Infiltration entspricht den Beobachtungen an menschlichen OP-Präparaten.

These 10:

Die akute DBTC-Pankreatitis ist gekennzeichnet durch eine Infiltration des Gewebes v.a. mit Makrophagen. Im Gegensatz dazu ergibt sich in den Tieren mit akuter Pankreatitis und Transfer mononukleärer Zellen von Ratten mit einer chronischen DBTC-Pankreatitis ein deutlich aggraviertes und verändertes Zellinfiltrations- und Zytokinmuster im Sinne einer chronischen Entzündungsreaktion.

These 11:

Die signifikant erhöhte Expression der lymphozyten-spezifischen Zytokine Interferon- γ und Interleukin-2 unterstreicht die Präsenz einer inflammatorischen Reaktion im Pankreas in

den Ratten mit akuter Pankreatitis und erfolgtem Lymphozytentransfer und korreliert mit den immunhistochemischen Ergebnissen. Diese Veränderungen entsprechen somit einer verstärkten Entzündungsreaktion, die einer chronischen Pankreatitis ähnelt.

These 12:

Wurden Lymphozyten aus Ratten mit chronischer DBTC-Pankreatitis auf gesunde Empfängertiere übertragen, so war dadurch keine verstärkte Entzündungsreaktion auszulösen. Im Empfängertier ist demzufolge eine Vorschädigung im Sinne einer akuten Pankreatitis erforderlich, um durch den Lymphozytentransfer eine zusätzliche Schädigung auszulösen.

These 13:

Durch den Transfer von Lymphozyten war in der sonst blanden und ohne Organdestruktion verlaufenden akuten DBTC-Pankreatitis eine erhöhte und anhaltende Entzündungsreaktion auszulösen. Der Verlauf und die Ergebnisse der untersuchten Parameter ähneln einer chronischen Pankreatitis.

These 14:

Die durch den Lymphozytentransfer aus Tieren mit chronischer DBTC-Pankreatitis hervorgerufenen Veränderungen haben insgesamt ein Ausprägungs-Maximum um den 21. Tag. Im weiteren Verlauf ist ein langsamer Rückgang der Entzündungsreaktion nachweisbar. Durch einen erneuten Transfer von Lymphozyten chronisch erkrankter Tiere an Tag 28 sollte diese Entzündungsreaktion wieder verstärkt werden können, um die Hypothese einer immunologischen Komponente der chronischen Pankreatitis zu belegen. Dies ist Bestandteil weiterer Untersuchungen.

7 Literaturverzeichnis

1. **Chiari, H.** "Über Selbstverdauung des menschlichen Pankreas." Z Heilkd 1896; 17; 69-96.
2. **Sarner, M., Cotton, P. B.** "Classification of pancreatitis." Gut 1984; 25; 756-9.
3. **Singer, M. V., Gyr, K., Sarles, H.** "Revised classification of pancreatitis. Report of the Second International Symposium on the Classification of Pancreatitis in Marseille, France, March 28-30, 1984." Gastroenterology 1985; 89; 683-5
4. **Sarles, H., Adler, G., Dani, R., Frey, C., Gullo, L., Harada, H., Martin, E., Norohna, M., Scuro, L. A.** "Classifications of pancreatitis and definition of pancreatic diseases." Digestion 1989; 43; 234-6.
5. **Copenhagen pancreatitis study.** "An interim report from a prospective epidemiological multicentre study." Scand J Gastroenterol 1981; 16; 305-12.
6. **Andersen, B. N., Pedersen, N. T., Scheel, J., Worning, H.** "Incidence of alcoholic chronic pancreatitis in Copenhagen." Scand J Gastroenterol 1982; 17; 247-52.
7. **Braganza, J. M.** "A framework for the aetiology of chronic pancreatitis." Digestion 1998; 59 Suppl 4; 1-12.
8. **Secknus, R., Mössner, J.** "Changes in incidence and prevalence of acute and chronic pancreatitis in Germany." Chirurg 2000; 71; 249-52.
9. **Teich, N., Keim, V.** "Pathogenetic concepts of chronic pancreatitis." Zentralbl Chir 2001; 126; 884-8.
10. **Thorsgaard, Pedersen N., Nyboe, Andersen B., Pedersen, G., Worning, H.** "Chronic pancreatitis in Copenhagen. A retrospective study of 64 consecutive patients." Scand J Gastroenterol 1982; 17; 925-31.
11. **Worning, H.** "Etiologic aspects of chronic pancreatitis. Review of current theories and experimental evidence." Int J Pancreatol 1989; 5 Suppl; 1-9.
12. **Ammann, R. W.** "Clinical aspects and differential diagnosis of chronic pancreatitis. Emphasis on the long term course in 258 patients." Schweiz Med Wochenschr 1980; 110; 1322-7.
13. **Lin, Y., Tamakoshi, A., Matsuno, S., Takeda, K., Hayakawa, T., Kitagawa, M., Naruse, S., Kawamura, T., Wakai, K., Aoki, R., Kojima, M., Ohno, Y.** "Nationwide epidemiological survey of chronic pancreatitis in Japan." J Gastroenterol 2000; 35; 136-41.
14. **Lankisch, P., Assmus, C., Maisonneuve, P., Lowenfels, A.** "Die Epidemiologie von Pankreaserkrankungen in Deutschland." Z Gastroenterol 2002; 39; 653.
15. **Lankisch, P. G., Lohr-Happe, A., Otto, J., Creutzfeldt, W.** "Natural course in chronic pancreatitis. Pain, exocrine and endocrine pancreatic insufficiency and prognosis of the disease." Digestion 2001; 54; 148-55.

16. **Singer, M. V., Müller, M. K.** "Epidemiologie, Ätiologie und Pathogenese der chronischen Pankreatitis." In: Mössner J, Adler G, Fölsch UR, Singer MV (Hrsg.): Erkrankungen des exkretorischen Pankreas. Gustav Fischer, Jena Stuttgart. 1995; 313-24.
17. **Ammann, R., Sulser, H.** "'Senile" chronic pancreatitis; a new nosologic entity? Studies in 38 cases. Indications of a vascular origin and relationship to the primarily painless chronic pancreatitis." Schweiz Med Wochenschr 1976; 106; 429-37.
18. **Ammann, R.** "Idiopathic "juvenile" chronic pancreatitis (author's transl)." Dtsch Med Wochenschr 1976; 101; 1789-94.
19. **Layer, P., Yamamoto, H., Kalthoff, L., Clain, J. E., Bakken, L. J., DiMagno, E. P.** "The different courses of early- and late-onset idiopathic and alcoholic chronic pancreatitis." Gastroenterology 1994; 107; 1481-7.
20. **Etemad, B., Whitcomb, D. C.** "Chronic pancreatitis: diagnosis, classification, and new genetic developments." Gastroenterology 2001; 120; 682-707.
21. **Mergener, K., Baillie, J.** "Chronic pancreatitis." Lancet 1997; 350; 1379-85.
22. **Forsmark, C. E.** "Chronic pancreatitis." In: Feldman M, Friedman LS, Sleisenger MH (Hrsg.): Gastrointestinal and Liver Disease, Band 1, 7. Aufl. Saunders, Philadelphia, London, New York 2002; 943-69.
23. **Ammann, R. W., Muellhaupt, B.** "The natural history of pain in alcoholic chronic pancreatitis." Gastroenterology 1999; 116; 1132-40.
24. **Lankisch, P.G., Seidensticker, F., Lohr-Happe, A., Otto, J., Creutzfeldt, W.** "The course of pain is the same in alcohol- and nonalcohol-induced chronic pancreatitis." Pancreas 1995; 10; 338-41.
25. **Miyake, H., Harada, H., Kunichika, K., Ochi, K., Kimura, I.** "Clinical course and prognosis of chronic pancreatitis." Pancreas 1987; 2; 378-85.
26. **Lankisch, P.G., Layer, P.** "Chronische Pankreatitis. Update: Diagnostik und Therapie." Dt Ärztebl 2000; 97; A 2169-77.
27. **DiMagno, E.P., Go, V.L.W., Summerskill, W.H.J.** "Relations between pancreatic enzyme outputs and malabsorption in severe pancreatic insufficiency." N Engl J Med 1973; 288; 813-15.
28. **Twersky, Y., Bank, S.** "Nutritional deficiencies in chronic pancreatitis." Gastroenterol Clin North Am 1989; 18; 543-65.
29. **Haaber, A.B., Rosenfalck, A.M., Hansen, B., Hilsted, J., Larsen, S.** "Bone mineral metabolism, bone mineral density, and body composition in patients with chronic pancreatitis and pancreatic exocrine insufficiency." Int J Pancreatol 2000; 27; 21-7.
30. **Mann, S.T., Stracke, H., Lange, U., Klör, H.U., Teichmann, J.** "Alterations of bone mineral density and bone metabolism in patients with various grades of chronic pancreatitis." Metabolism 2003; 52; 579-85.

31. **Mann, S.T., Stracke, H., Lange, U., Klör, H.U., Teichmann, J.** "Vitamin D3 in patients with various grades of chronic pancreatitis, according to morphological and functional criteria of the pancreas." *Dig Dis Sci* 2003; 48; 533-8.
32. **Malka, D., Hammel, P., Sauvanet, A., Rufat, P., O'Toole, D., Bardet, P., Belghiti, J., Bernades, P., Ruszniewski, P., Lévy, P.** "Risk Factors for Diabetes Mellitus in Chronic Pancreatitis." *Gastroenterology* 2000; 119; 1324-32.
33. **Lankisch, P.G., Nauck, M.** "Diabetes und chronische Pankreatitis. Wann, wie oft und wie zu therapieren ?" *Dt Ärztebl* 2000; 97; A 1894-5.
34. **Sarles, H., Sahel, J.** "Cholestasis and lesions of the biliary tract in chronic pancreatitis." *Gut* 1978; 19; 851-7.
35. **Huizinga, W.K.J., Thomson, S.R., Spitaels, J.-M., Simjee, A.E.** "Chronic pancreatitis with biliary obstruction." *Ann R Coll Surg Engl* 1992; 74; 119-25.
36. **Kataoka, K., Hosoda, M., Yasuda, H., Sakagami, J., Kato, M., Kashima, K.** "Assessment of exocrine pancreatic dysfunction in chronic pancreatitis." *Digestion* 2000; 60 Suppl 1; 86-92.
37. **Thorsgaard Pedersen, N., Worning, H.** "Chronic pancreatitis." *Scand J Gastroenterol* 1996; 31 Suppl 216; 52-8.
38. **Clain, J.E., Pearson, R.K.** "Diagnosis of chronic pancreatitis. Is a gold standard necessary?" *Surg Clin North Am* 1999; 79; 829-45.
39. **Ammann, R.** "Diagnose und Therapie der alkoholischen chronischen Pankreatitis. Eine kritische Standortbestimmung." *Schweiz Med Wschr* 1995; 115 Suppl 19; 42-51.
40. **Malfertheiner, P., Glasbrenner, B.** "Exokrine Pankreasfunktionstests. In: Mössner J, Adler G, Fölsch UR, Singer MV (Hrsg.): *Erkrankungen des exkretorischen Pankreas*." Gustav Fischer, Jena Stuttgart 1995; 147-55.
41. **Hanck, C., Singer, M.V.** "Klassifikation der chronischen Pankreatitis." *Z Gastroenterol* 1999; 37; 113-5.
42. **Lankisch, P.G., Seidensticker, F., Otto, J., Lübbers, H., Mahlke, R., Stöckmann, F., Fölsch, U.R., Creutzfeldt, W.** "Secretin-pancreozymin test (SPT) and endoscopic retrograde cholangiopancreatography (ERCP): both are necessary for diagnosing or excluding chronic pancreatitis." *Pancreas* 1996; 12; 149-52.
43. **Seidensticker, F., Otto, J., Lankisch, P.G.** "Recovery of the pancreas after acute pancreatitis is not necessarily complete." *Int J Pancreatol* 1995; 17; 225-9.
44. **Angelini, G., Cavallini, G., Pederzoli, P., Bovo, P., Bassi, C., Di Francesco, V., Frulloni, L., Sgarbi, D., Talamini, G., Castagnini, A.** "Long-term outcome of acute pancreatitis: a prospective study with 118 patients." *Digestion* 1993; 54; 143-7.
45. **Singer, M.V., Teyssen, S.** "Serie - Alkoholismus: Alkoholassozierte Organschäden. Befunde in der Inneren Medizin, Neurologie und Geburtshilfe / Neonatologie." *Dt Ärztebl* 2001; 98; A 2109-20.

46. **Testoni, P.A., Caporuscio, S., Bagnolo, F., Lella, F.** "Idiopathic recurrent pancreatitis: longterm results after ERCP, endoscopic sphincterotomy or ursodeoxycholic acid treatment." *Am J Gastroenterol* 2000; 95; 1702-7.
47. **Cavallini, G., Frulloni, L., Pederzoli, P., Talamini, G., Bovo, P., Bassi, C., Di Francesco, V., Vaona, B., Falconi, M., Sartori, N., Angelini, G., Brunori, M.P., Filippini, M.** "Long-term follow-up of patients with chronic pancreatitis in Italy." *Scand J Gastroenterol* 1998; 33; 880-9.
48. **Dani, R., Penna, F.J., Nogueira, C.E.** "Etiology of chronic calcifying pancreatitis in Brazil: a report of 329 consecutive cases." *Int J Pancreatol* 1986; 1; 399-406
49. **Durbec, J.P., Sarles, H.** "Multicenter survey of the etiology of pancreatic diseases. Relationship between the relative risk of developing chronic pancreatitis and alcohol, protein and lipid consumption." *Digestion* 2000; 18: 337-50.
50. **Glasbrenner, B., Adler, G.** "Entzündliche Erkrankungen des Pankreas." In: Adler G, Beglinger C, Manns MP, Müller-Lissner S, Schmiegel W (Hrsg.): *Klinische Gastroenterologie und Stoffwechsel*. Springer, Berlin Heidelberg New York, 2000; 369.
51. **Haber, P., Wilson, J., Apte, M., Korsten, M., Pirola, R.** "Individual susceptibility to alcoholic pancreatitis: still an enigma." *J Lab Clin Med* 1995; 125; 305-12.
52. **Wilson, J.S., Bernstein, L., McDonald, C., Tait, A., McNeil, D., Pirola, R.C.** "Diet and drinking habits in relation to the development of alcoholic pancreatitis." *Gut* 1985; 26; 882-7.
53. **Layer, P., Holtmann, G.** "Exokrine Pankreasfunktion bei chronischer Pankreatitis." In: Delbrück H, Layer P, Kaiser D, Bosseckert H, Ditschuneit H (Hrsg.): *Die Gesichter der Pankreasinsuffizienz*. Einhorn-Press, Reinbek 1994; 41-57.
54. **Seitz, H.K.** "Wie viel Alkohol macht krank ? Trägt Alkohol zur Gesundheit bei ? Ergebnisse einer Arbeitstagung der Deutschen Hauptstelle gegen Suchtgefahren." *Dt Arztebl* 2000; 97; A 1538-41.
55. **Schneider, A., Lühr, J.M., Singer, M.V.** "The M-ANNHEIM classification of chronic pancreatitis: introduction of a unifying classification system based on a review of previous classifications of the disease." *J Gastroenterol* 2007; 42(2):101-19.
56. **Gullo, L., Barbara, L., Labo, G.** "Effect of cessation of alcohol use on the course of pancreatic dysfunction in alcoholic pancreatitis." *Gastroenterology* 1988; 95; 1063-8.
57. **Corrao, G., Bagnardi, V., Zambon, A., Arico, S.** "Exploring the dose-response relationship between alcohol consumption and the risk of several alcohol-related conditions: a meta-analysis." *Addiction* 1999; 94; 1551-73.
58. **Ectors, N., Maillet, B., Aerts, R., Geboes, K., Donner, A., Borchard, F., Lankisch, P., Stolte, M., Luttges, J., Kremer, B., Kloppel, G.** "Non-alcoholic duct destructive chronic pancreatitis." *Gut* 1997; 41; 263-8.

59. **Hoe, L.v., Gryspeerdt, S., Ectors, N., Steenberg, W.v., Aerts, R., Baert, A.L., Marchal, G.** "Nonalcoholic duct-destructive chronic pancreatitis: imaging findings." *AJR Am J Roentgenol* 1998; 170; 643-7.
60. **Lankisch, M.R., Imoto, M., Layer, P., DiMagno, E.P.** "The Effect of Small Amounts of Alcohol on the Clinical Course of Chronic Pancreatitis." *Mayo Clin Proc* 2001; 76; 242-51.
61. **Cohn, J.A., Friedman, K.J., Noone, P.G., Knowles, M.R., Silverman, L.M., Jowell, P.S.** "Relation between mutations of the cystic fibrosis gene and idiopathic pancreatitis." *N Engl J Med* 1998; 339; 653-8.
62. **Sharer, N., Schwarz, M., Malone, G., Howarth, A., Painter, J., Super, M., Braganza, J.** "Mutations of the cystic fibrosis gene in patients with chronic pancreatitis." *N Engl J Med* 1998; 339; 645-52.
63. **Pfützer, R.H., Barmada, M.M., Brunskill, A.P., Finch, R., Hart, P.S., Neoptolemos, J., Furey, W.F., Whitcomb, D.C.** "SPINK1/PSTI polymorphisms act as disease modifiers in familial and idiopathic chronic pancreatitis." *Gastroenterology* 2000; 119; 615-23.
64. **Witt, H., Luck, W., Hennies, H.C., Classen, M., Kage, A., Lass, U., Landt, O., Becker, M.** "Mutations in the gene encoding the serine protease inhibitor, Kazal type 1 are associated with chronic pancreatitis." *Nat Genet* 2000; 25; 213-6.
65. **Jaster, R., Emmrich, J.** "Molecular characteristics of autoimmune pancreatitis." *Current Pharmaceutical Design* 2006; 12; 3781-6.
66. **Sarles, H., Bernard, J.P., Johnson, C.** "Pathogenesis and epidemiology of chronic pancreatitis." *Annu Rev Med* 1989; 40; 453-68.
67. **Ohashi, K., Kim, J. H., Hara, H., Aso, R., Akimoto, T., Nakama, K.** "WBN/Kob rats. A new spontaneously occurring model of chronic pancreatitis." *Int J Pancreatol* 1990; 6; 231-47.
68. **Xie, M. J., Motoo, Y., Su, S. B., Sawabu, N.** "Expression of tumor necrosis factor-alpha, interleukin-6, and interferon-gamma in spontaneous chronic pancreatitis in the WBN/Kob rat." *Pancreas* 2001; 22; 400-8.
69. **Xie, M. J., Motoo, Y., Su, S. B., Mouri, H., Sawabu, N.** "Induction of chemokines in rat pancreatic acinar cell injury." *Pancreas* 2002; 24; 198-204.
70. **Takano, S., Kimura, T., Yamaguchi, H., Kinjo, M., Nawata, H.** "Effects auf stress on the development of chronic pancreatitis." *Pancreas* 1992; 7; 548-55.
71. **Goto, M., Nakano, I., Kimura, T., Miyahara, T., Kinjo, M., Nawata, H.** "New chronic pancreatitis model with diabetes induced by caerulein plus stress in rats." *Dig Dis Sci* 1995; 40; 2356-63.
72. **Puig-Divi, V., Molero, X., Salas, A., Guarner, F., Guarner, L., and Malagelada, J. R.** "Induction of chronic pancreatic disease by trinitrobenzene sulfonic acid infusion into rat pancreatic ducts." *Pancreas* 1996; 13; 417-24.

73. **Sarles, H., Lebreuil, G., Tasso, F., Figarella, C., Clemente, F., Devaux, M.A., Fagonde, B., Payan, H.** A comparison of alcoholic pancreatitis in rat and man. *Gut* 1971; 12; 377-88.
74. **Lieber, C.S., DeCarli, L.M.** "Liquid diet technique of ethanol administration: 1989 update." *Alcohol* 1989; 24; 197-211.
75. **Singh, M.** "Alcoholic pancreatitis in rats fed ethanol in a nutritionally adequate liquid diet." *Int J Pancreatol* 1987; 2; 311-24.
76. **Sanvito, F., Nichols, A., Herrera, P.L., Huarte, J., Wohlwend, A., Vassalli, J.D., Orci, L.** "TGF-beta 1 overexpression in murine pancreas induces chronic pancreatitis and, together with TNFalpha, triggers insulin-dependent diabetes." *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 217; 1279-86.
77. **Walker, N.** "Ultrastructure of the rat pancreas after experimental duct ligation. The role of apoptosis and intraepithelial macrophages in acinar cell deletion. *Am J Pathol* 1987; 126; 439-51.
78. **Pfeffer, R.B., Stasior, O., Hinton, J.W.** "The clinical picture of the sequential development of acute hemorrhagic pancreatitis in the dog." *Surg Forum* 1957 8; 248-51.
79. **Vallance, B. A., Hewlett, B. R., Snider, D. P., and Collins, S. M.** "T cell-mediated exocrine pancreatic damage in major histocompatibility complex class II-deficient mice." *Gastroenterology* 1998; 115; 978-87.
80. **Hense, S., Sparmann, G., Weber, H., Liebe, S., Emmrich, J.** "Immunologic Charakterization of Acute Pancreatitis in Rats Induced by Dibutyltin Dichloride (DBTC)." *Pancreas* 2003; 27; 1; e6-e12.
81. **Sparmann, G., Behrend, S., Merkord, J., Kleine, H. D., Graser, E., Ritter, T., Liebe, S., and Emmrich, J.** "Cytokine mRNA levels and lymphocyte infiltration in pancreatic tissue during experimental chronic pancreatitis induced by dibutyltin dichloride." *Dig Dis Sci* 2001; 46; 1647-56.
82. **Sparmann, G., Jaschke, A., Loehr, M., Liebe, S., and Emmrich, J.** "Tissue homogenization as a key step in extracting RNA from human and rat pancreatic tissue." *Biotechniques* 1997; 22; 408-10, 412.
83. **Murphy, E., Hieny, S., Sher, A., O'Garra, A.** "Detection of in vivo expression of interleukin-10 using a semi-quantitative polymerase chain reaction method in *Schistosoma mansoni* infected mice." *J Immunol Methods* 1993; 162; 211-223.
84. **Pitchumoni, C.S.** "Pathogenesis of alcohol-induced chronic pancreatitis: facts, perceptions, and misperceptions." *Surg Clin North Am* 2001; 81; 379-90.
85. **Esposito, I., Friess, H., Büchler, M.W.** "Molecular mechanisms in chronic pancreatitis." *Zentralbl Chir* 2001; 126; 867-72.
86. **Jalleh, R. P., Gilbertson, J. A., Williamson, R. C., Slater, S. D., Foster, C. S.** "Expression of major histocompatibility antigens in human chronic pancreatitis." *Gut* 1993; 34; 1452-7.

87. **Thomas, R., Lipsky, P. E.** "Could endogenous self-peptides presented by dendritic cells initiate rheumatoid arthritis." *Immunol Today* 1996; 17; 559-64.
88. **Klöppel, G., Detlefsen, S., Feyerabend, B.** "Fibrosis of the pancreas: the initial tissue damage and the resulting pattern." *Virchows Arch* 2004; 445 (1), 1-8.
89. **Sparmann, G., Merkord, J., Jaschke, A., Nizze, H., Jonas, L., Lohr, M., Liebe, S., Emmrich, J.** "Pancreatic fibrosis in experimental pancreatitis induced by dibutyltin dichloride." *Gastroenterology* 1997; 112; 1664-72.
90. **Demols, A., Le Moine, O., Desalle, F., Quertinmont, E., Van Laethem, J. L., Deviere, J.** "CD4(+)T cells play an important role in acute experimental pancreatitis in mice." *Gastroenterology* 2000; 118; 582-90.
91. **Behrend, S., Merkord, J., Sparmann, G., Liebe, S., Emmrich, J.** "Anti CD4 antibody therapy in experimental chronic pancreatitis in rats." *Gastroenterology* 1999; 116, A1121, G4860.
92. **Mosmann, T.R., Sad, S.** "The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more." *Immunol Today* 1996; 17:138-46.
93. **Hunger, R. E., Mueller, C., Z'graggen, K., Friess, H., Buchler, M. W.** "Cytotoxic cells are activated in cellular infiltrates of alcoholic chronic pancreatitis." *Gastroenterology* 1997; 112; 1656-63.
94. **Mosmann, T. R., Coffman, R. L.** "TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties." *Annu Rev Immunol* 1989; 7; 145-73.
95. **Bode, U., Wonigeit, K., Pabst, R., Westermann, J.** "The fate of activated T cells migrating through the body: rescue from apoptosis in the tissue of origin." *Eur J Immunol* 1997; 27; 2087-93.
96. **Bordalo, O., Goncalves, D., Noronha, M., Cristina, M.L., Salgado, A., Dreiling, D.A.** "Newer concept for the pathogenesis of chronic alcoholic pancreatitis." *Am J Gastroenterol* 1977; 68: 278-85.
97. **Braganza, J.M.** "Pancreatic disease: a casualty of hepatic "detoxification"?" *Lancet* 1983; II: 1000-3.
98. **Mössner, J., Keim, V., Niederau, C., Büchler, M., Singer, M.V., Lankisch, P.G., Göke, B.** "Leitlinie der Therapie der chronischen Pankreatitis." *Z Gastroenterol* 1996; 36; 359-67.
99. **Klöppel, G., Maillet, B.** "Pathology of acute and chronic pancreatitis." *Pancreas* 1993; 8; 659-70.
100. **Guy, O., Robles-Diaz, G., Adrich, Z., Sahel, J., Sarles, H.** "Protein content of precipitates present in pancreatic juice of alcoholic subjects and patients with chronic calcifying pancreatitis." *Gastroenterology* 1983; 84: 102-7.

101. **Yamadera, K., Moriyama, T., Makino, I.** "Identification of immunoreactive pancreatic stone protein in pancreatic stone, pancreatic tissue, and pancreatic juice". *Pancreas* 1990; 5: 255-60.
102. **Kazuichi, O.** "Clinical relevance of autoimmune-related pancreatitis." *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 2002; Volume 16, Issue 3, Pages 365-78.
103. **Sarles, H.** "Proposal adopted unanimously by the participants of the Symposium", Marseilles 1963; in: *Pancreatitis. Bibl. Gastroenterol.* 7; Hrsg. Sarles H. Karger, Basel-New York 1965, VII-VIII.
104. **Merkord, J., Jonas, L., Weber, H., Kroning, G., Nizze, H., Hennighausen, G.** "Acute interstitial pancreatitis in rats induced by dibutyltin dichloride (DBTC): pathogenesis and natural course of lesions." *Pancreas* 1997; 15; 392-401.
105. **Emmrich, J., Weber, I., Nausch, M., Sparmann, G., Koch, K., Seyfarth, M., Löhr, M., Liebe, S.** "Immunohistochemical characterization of the pancreatic cellular infiltrate in normal pancreas, chronic pancreatitis and pancreatic carcinoma." *Digestion* 1998; 59:192-8
106. **Merkord, J., Weber, H., Sparmann, G., Jonas, L., Henninghausen, G.** "The course of pancreatic fibroses induced by dibutyltin dichloride (DBTC). *Ann N Y Acad Sci* 1999; 880:231-7.
107. **Johnson, R.L., Ziff, M.** "Lymphokine stimulation of collagen accumulation." *J Clin Invest* 1976; 58:240-52.
108. **Emmrich, J., Weber, I., Nausch, M., Sparmann, G., Koch, K., Seyfarth, M., Löhr, M., Liebe, S.** "Immunohistochemical characterization of the pancreatic cellular infiltrate in normal pancreas, chronic pancreatitis and pancreatic carcinoma." *Digestion* 1998; 59:192-8.
109. **Ebert, M.P., Ademmer, K., Muller-Ostermeyer, F., Friess, H., Buchler, M.W., Schubert, W., Malfertheiner, P.** "CD8+CD103+ T cells analogous to intestinal intraepithelial lymphocytes infiltrate the pancreas in chronic pancreatitis." *Am J Gastroenterol* 1998; 93:2141-7.
110. **Bedossa, P., Bacci, J., Lemaigre, G., Martin, E.** "Lymphocyte subsets and HLA-DR expression in normal pancreas and chronic pancreatitis." *Pancreas* 1990; 5:415-20.
111. **Schütt, C., Friemel, H., Schulze, H.A., Leithausser, W., Zubaidi, G.** "Lymphocyte transformation test in the diagnosis of chronic pancreatitides." *Z Gesamte Inn Med* 1975; 30:412-5.
112. **Velbri, S., Nutt, H., Kasesalu, G.** "Immunologic mechanisms in pancreatic diseases." *Z Gesamte Inn Med* 1973; 28:222-7.
113. **de Vries, J.E.** "Immunosuppressive and anti-inflammatory properties of interleukin 10." *Ann Med* 1995; 27:537-41.

114. **Duseti, N.J., Frigerio, J.M., Keim, V., Dagorn, J.C., Iovanna, J.L.** "Structural organization of the gene encoding the rat pancreatitis-associated protein. Analysis of its evolutionary history reveals an ancient divergence from the other carbohydrate-recognition domain-containing genes." *J Biol Chem* 1993; 268:14470-5.
115. **Duseti, N.J., Ortiz, E.M., Mallo, G.V., Dagorn, J.C., Iovanna, J.L.** "Pancreatitis-associated protein I (PAP I), an acute phase protein induced by cytokines. Identification of two functional interleukin-6 response elements in the rat PAP I promoter region." *J Biol Chem* 1995; 270:22417-21.
116. **Pezzilli, R., Billi, P., Miniero, R., Barakat, B.** "Serum interleukin-10 in human acute pancreatitis." *Dig Dis Sci* 1997; 42:1469-72.
117. **Okada, M., Kitahara, M., Kishimoto, S., Matsuda, T., Hirano, T., Kishimoto, T.** "IL-6/BSF-2 functions as a killer helper factor in the in vitro induction of cytotoxic T cells." *J Immunol* 1988; 141:1543-9.
118. **Guice, K.S., Miller, D.E., Oldham, K.T., Townsend, C.M. Jr., Thompson, J.C.** "Superoxide dismutase and catalase: a possible role in established pancreatitis." *Am J Surg* 1986; Jan;151(1):163-9.
119. **Klöppel, G., Sipos, B., Lüttges, J.** "Das Spektrum der chronischen Pankreatitis." *Pathologe* 2005; 26:59-66.
120. **Witt, H., Apte, M.V., Keim, V., Wilson, J.S.** "Chronic Pancreatitis: Challenges and Advances in Pathogenesis, Genetics, Diagnosis, and Therapy." *Gastroenterology* 2007; 132:1557-73.
121. **Yoshida, K., Toki, F., Takeuchi, T., Watanabe, S., Shiratori, K., Hayashi, N.** "Chronic pancreatitis caused by an autoimmune abnormality. Proposal of the concept of autoimmune pancreatitis." *Dig Dis Sci* 1996; 40:1561-8.
122. **Ito, T., Nakano, I., Koyanagi, S., Miyahara, T., Migita, Y., Ogoshi, K., Sakai, H., Matsunaga, S., Yasuda, O., Sumii, T., Nawata, H.** "Autoimmune pancreatitis as a new clinical entity. Three cases of autoimmune pancreatitis with effective steroid therapy." *Dig Dis Sci* 1997; 42:1458-68.
123. **Mössner, J., Keim, V.** "Klinik, Diagnostik und conservative Therapie der chronischen Pankreatitis." *Aus Riemann u. a.* 2010; *Gastroenterologie* (ISBN 9783131546517), Georg Thieme Verlag KG.
124. **Ockenga, J., Jacobs, R., Kemper, A., Benschop, R.J., Schmidt, R.E., Manns, M.P.** "Lymphocyte subsets and cellular immunity in patients with chronic pancreatitis." *Digestion* 2000; 62:14-21.
125. **Romagnani, S.** "Lymphokine production by human T cells in disease states." *Annu Rev Immunol* 1994; 12:227-57.
126. **Farrar, W.L., Johnson, H.M., Farrar, J.J.** "Regulation of the production of immune interferon and cytotoxic T lymphocytes by interleukin 2." *J Immunol* 1981; 126:1120-5.
127. **Friemel, H.** "Interleukins 1-8." *Allerg Immunol (Leipzig)* 1990; 36:195-208.

128. **Okazaki, K., Chiba, T.** "Autoimmune related pancreatitis." *J Gastroenterol Gut* 2002; 51:1-4.
129. **Wilke, C. M., Bishop, K., Fox, D., Zou, W.** "Deciphering the role of Th17 cells in human disease." *Trends in Immunology* December 2011; Vol. 32, No.12, 603-11.
130. **Bolon, B.** "Cellular and Molecular Mechanisms of Autoimmune Disease." *Toxicologic Pathology* 2011; 00:1-14.
131. **Bachem, M.G., Schneider, E., Gross, H., Weidenbach, H., Schmid, R.M.** "Identification, culture, and characterization of pancreatic stellate cells in rats and humans." *Gastroenterology* 1998; 115:421-32.
132. **Apte, M.V., Haber, P.S., Applegate, T.L., Norton, I.D., McCaughan, G.W., Korsten, M.A., Pirola, R.C., Wilson, J.S.** "Periacinar stellate shaped cells in rat pancreas: identification, isolation, and culture." *Gut* 1998;43:128-33.
133. **Sparmann, G., Glass, A., Brock, P., Jaster, R., Koczan, D., Thiesen, H.J., Liebe, S., Emmrich, J.** "Inhibition of lymphocyte apoptosis by pancreatic stellate cells: impact of interleukin-15." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005; 289(5):G842-51.
134. **He, J., Sun, X., Qian, K.Q., Liu, X., Wang, Z., Chen, Y.** "Protection of cerulein-induced pancreatic fibrosis by pancreas-specific expression of Smad7." *Biochim Biophys Acta* 2009; 1792(1):56-60.
135. **Siegling, A., Lehmann, M., Platzer, C., Emmrich, F., Volk, H.D.** "A novel multispecific fragment for quantitative PCR analysis of cytokine gene expression in rats." *J Immunol Methods* 1994; 177:23-8.

8 Abkürzungsverzeichnis

0-LT	Lymphozyten-Transfer Kontrolle 2 (Transfer von mononukleären Zellen chronischer Pankreatitis-Ratten in gesunde Tiere)
AG	Antigen
AIP	Autoimmunpankreatitis
AK	Antikörper
aP*+LT*	Lymphozyten-Transfer (Transfer mononukleärer Zellen von Tieren mit chronischer Pankreatitis in Tiere mit akuter DBTC-Pankreatitis)
aP+LT-0	Lymphozyten-Transfer-Tiere Kontrolle 1 (Transfer von mononukleären Zellen gesunder Tiere in Tiere mit akuter DBTC-Pankreatitis)
aP	Akute Pankreatitis
AP	Alkalische Phosphatase
APAAP	Alkalische Phosphatase-anti-Alkalische Phosphatase
CD	clusters of differentiation
CDL	closed duodenal loop – Duodenum-Ligatur proximal und distal der Papille
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CFTR	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
cP	Chronische Pankreatitis
dATP	Desoxyadenintriphosphat
DBTC	Dibutylzinn-Dichlorid
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
dGTP	Desoxyguanintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure = Ethylendiamintetraacetat
ERP	endoskopisch retrograde Pankreatographie
EZM	extrazelluläre Matrix
FACS	Fluoreszenz aktivierte Zell-Sortierung / Durchflusszytometrie
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
IFN-γ	Interferon- γ
Ig	Immunglobulin
IgG	Immunglobulin der Klasse G
IHC	Immunhistochemie

IL-2	Interleukin-2
IL-2-R	Interleukin-2-Rezeptor
IL-4	Interleukin-4
IL-5	Interleukin-5
IL-6	Interleukin-6
IL-10	Interleukin-10
KF	Kontrollfragment
LNC	Mononukleäre Zellen aus Lymphknoten = lymph node mononuclear cells
LT	Lymphozyten-Transfer
MHC	major histocompatibility complex
MNC	Mononukleäre Zellen
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
MW	Mittelwert
PBMC	MNC aus peripherem Blut = peripheral blood mononuclear cells
PBS	phosphatgepufferte Kochsalz-Lösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PSZ	Pankreatische Sternzellen
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkriptase Verfahren zur Herstellung von cDNA aus RNA
SD	Standardabweichung
SMC	Mononukleäre Zellen aus der Milz = spleen mononuclear cells
SOD	Superoxid-Dismutase
SPINK1	serin protease inhibitor type Kazal 1
TBS-Puffer	Tris-gepufferte Kochsalz-Lösung

Abkürzungen der Antikörper:

RK4	monoklonaler Antikörper gg. Ratten-Granulozyten
OX33	monoklonaler AK gg. CD45RA (B-Lymphozyten)
R73	monoklonaler AK gg. $\alpha\beta$ -T-Zell-Rezeptor (T-Zellen)
OX38	monoklonaler AK gg. CD4-Antigen (CD4 ⁺ T-Helfer-Zellen)
OX8	monoklonaler AK gg. CD8-AG (CD8 ⁺ T-Suppressor-Zellen)
OX39	monoklonaler AK gg. CD25 / IL-2R α -Kette
Mo(HIS36)	monoklonaler AK gg. ED2-AG (Gewebe-Makrophagen)
FITC	Fluorescein-Isothiocyanate markierter sek. Schaf-anti-Maus-IgG-Antikörper

9 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. med. Jörg Emmrich für die Überlassung des Themas und für seine Unterstützung und Geduld mit mir. Sehr geschätzt habe ich seinen Umgang mit den Doktoranden und das teilweise väterlich anmutende Geben von guten Ratschlägen. Bedauerlicherweise verstarb der von Vielen nur ehrfürchtig „Der Oberarzt“ genannte sehr plötzlich und unerwartet in viel zu jungen Jahren.

Ganz besonders hervorzuheben ist Frau Dr. Gisela Sparmann, die mit ständiger Präsenz im Labor und einer großen Hilfsbereitschaft bei Fragen und Problemen eine große Unterstützung war. Diese bezog sich nicht nur auf Fragen zu Laborversuchen, sondern auch auf die Bereitstellung von Literatur und zahlreichen konstruktiven Vorschlägen zur Korrektur dieser Arbeit. Der von ihr geleistete Beitrag war nur zu einem kleinen Anteil mit der Hilfe bei Computer-Problemen zurückzuzahlen.

Ein großer Dank geht auch an Herrn Prof. Dr. med. Robert Jaster, der sich durch das traurige Schicksal von Prof. Emmrich mit meiner Arbeit befassen „musste“. Letztendlich ist es zu einem sehr großen Teil ihm zu verdanken, dass es schließlich doch noch zu einem Abschluss der Arbeit kam. Vielleicht hat erst das Setzen einer Deadline die nötigen Reserven mobilisieren können.

Daneben möchte ich allen Kollegen der Arbeitsgruppe für die Unterstützung und Zusammenarbeit danken, hier v.a. Fr. Kathrin Sievert-Küchenmeister, die mir im Tier-OP schon in den frühen Morgenstunden helfend zur Seite stand. Natürlich möchte ich auch Fr. Inge Weber für die geduldige Betreuung der immunhistochemischen Färbungen und anschließender Auszählung danken. Darüber hinaus danke ich Herrn Dr. H.-D. Kleine und Frau Buchmann für die Betreuung bei der Durchführung der FACS-Messungen.

10 Selbständigkeitserklärung

Diese Dissertation wurde weder gegenwärtig noch in der Vergangenheit bei einer anderen Fakultät eingereicht.

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Stuttgart, 28.12.2011

Kai Rieckeheer

11 Tabellarischer Lebenslauf

Persönliche Angaben:

Name	Kai Lukas Rieckeheer
Geburt	18.07.1976 in Münster (Westfalen)
Nationalität	deutsch
Familienstand	verheiratet

Schulbildung und Ersatzdienst:

1982 – 1995	Schulbesuch in Bad Bentheim, Abitur
1995 – 1996	Ersatzdienst beim Rettungsdienst des Deutschen Roten Kreuzes (DRK) in Nordhorn (Ldkr. Grafschaft Bentheim)

Universitäre Ausbildung:

10/1996 – 11/2003	Studium der Humanmedizin an der Universität Rostock
09/1998	Ärztliche Vorprüfung (Physikum)
08/1999	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (1. Staatsexamen)
03/2002	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (2. Staatsexamen)
10/2002 – 01/2003	Praktisches Jahr (PJ): Klinik für Allgemeinchirurgie und Klinik für Unfallchirurgie, Universitätsklinik Rostock
02/2003 – 05/2003	Praktisches Jahr (PJ): Klinik für Anästhesie, Universitätsklinik Rostock
06/2003 – 10/2003	Praktisches Jahr (PJ): Klinik für Innere Medizin (KIM), Abt. f. Gastroenterologie, Universitätsklinik Rostock
11/2003	3. Staatsexamen

Berufstätigkeit:

12/2003 – 09/2004	Arzt im Praktikum (AiP), Klinik für Innere Medizin (KIM), Abt. für Gastroenterologie, Universitätsklinik Rostock
10/2004 – 09/2005	Assistenzarzt, Klinik für Innere Medizin (KIM), Abt. für Gastroenterologie, Universitätsklinik Rostock
12/2005 – 01/2010	Assistenzarzt, Klinik für Innere Medizin, Gastroenterologie und Hepatologie, Klinikum Stuttgart, Krankenhaus Bad Cannstatt
08/2007	Zusatzbezeichnung Notfallmedizin
02/2010 – 10/2011	Assistenzarzt, Medizinische Klinik 3, Klinik für Diabetologie, Endokrinologie und Geriatrie, Klinikum Stuttgart, Bürgerhospital
09/2010	Facharztanerkennung Innere Medizin
seit 11/2011	Weiterbildungsassistent, Praxis für Endokrinologie und Diabetologie im Zentrum, Prof. Dr. M. Grußendorf, Dr. K. Bacher, Dr. B. Feldmann, Dr. A. Cordes, Sophienstr. 40, 70178 Stuttgart